

10/520783
Rec'd PCT/PTO 10 JAN 2005
PCT/JP 03/08690 #2

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

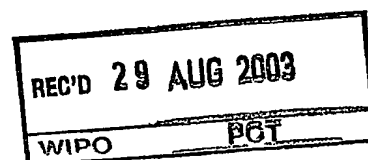
09.07.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 7 月 1 0 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 2 0 1 8 5 6
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 2 0 1 8 5 6]



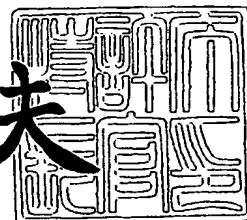
出 願 人 武田薬品工業株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 8 月 1 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 B02233

【提出日】 平成14年 7月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 38/17
C07K 14/47
C12N 15/12
G01N 33/53

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市雲雀丘山手2丁目21-23

【氏名】 松澤 佑次

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市高野台2丁目7-9

【氏名】 船橋 徹

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府豊中市東豊中町1丁目33-11

【氏名】 下村 伊一郎

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市灘区篠原台6番2号

【氏名】 古山 直樹

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100114041

【弁理士】

【氏名又は名称】 高橋 秀一

【選任した代理人】

【識別番号】 100106323

【弁理士】

【氏名又は名称】 関口 陽

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9909276

【包括委任状番号】 0203423

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 脂肪細胞で発現する新規分泌または膜蛋白質遺伝子およびその用途

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の (a) ~ (c) のいずれかのポリヌクレオチド。

(a) 配列番号: 2 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド

(b) 配列番号: 1 で表わされる塩基配列中、塩基番号 189 ~ 812 で示される塩基配列からなるポリヌクレオチド

(c) 上記 (b) のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含み、且つ配列番号: 2 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド

【請求項2】 以下の (a) ~ (c) のいずれかのポリヌクレオチド。

(a) 配列番号: 4 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド

(b) 配列番号: 3 で表わされる塩基配列中、塩基番号 24 ~ 572 で示される塩基配列からなるポリヌクレオチド

(c) 上記 (b) のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含み、且つ配列番号: 4 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド

【請求項3】 以下の (a) または (b) のポリヌクレオチド。

(a) FERM BP-8105 株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド

(b) 上記 (a) のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含み、且つ上記 (a) のポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド

【請求項4】 (a) 記載のポリヌクレオチドが、配列番号：5で表わされる塩基配列からなる請求項3記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】 以下の (a) または (b) のポリヌクレオチド。

(a) FERM BP-8107株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド

(b) 上記 (a) のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含み、且つ上記 (a) のポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド

【請求項6】 (a) 記載のポリヌクレオチドが、配列番号：9で表わされる塩基配列からなる請求項5記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】 以下の (a) または (b) のポリヌクレオチド。

(a) FERM BP-8108株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド

(b) 上記 (a) のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含み、且つ上記 (a) のポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド

【請求項8】 (a) 記載のポリヌクレオチドが、配列番号：11で表わされる塩基配列からなる請求項7記載のポリヌクレオチド。

【請求項9】 以下の (a) または (b) のポリヌクレオチド。

(a) FERM BP-8103株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド

(b) 上記 (a) のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含み、且つ上記 (a) のポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド

【請求項10】 (a) 記載のポリヌクレオチドが、配列番号：14で表わされる塩基配列からなる請求項9記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】以下の (a) または (b) のポリヌクレオチド。

(a) FERM BP-8104 株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド

(b) 上記 (a) のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含み、且つ上記 (a) のポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド

【請求項 12】(a) 記載のポリヌクレオチドが、配列番号：17 で表わされる塩基配列からなる請求項 11 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】以下の (a) または (b) のポリヌクレオチド。

(a) FERM BP-8102 株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド

(b) 上記 (a) のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含み、且つ上記 (a) のポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド

【請求項 14】(a) 記載のポリヌクレオチドが、配列番号：20 で表わされる塩基配列からなる請求項 13 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 15】以下の (a) または (b) のポリヌクレオチド。

(a) FERM BP-8110 株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド

(b) 上記 (a) のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含み、且つ上記 (a) のポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド

【請求項 16】(a) 記載のポリヌクレオチドが、配列番号：23 で表わされる塩基配列からなる請求項 15 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 17】所定の宿主細胞内で機能的なプロモーターの制御下にある請求項 1～16 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。

【請求項 18】請求項 17 記載の発現ベクターを導入された宿主細胞。

【請求項 19】請求項 18 記載の細胞を培地中で培養し、得られる培養物から請求項 1～16 のいずれかに記載のポリヌクレオチドによりコードされるペプチドまたはその塩を回収することを含む、該ペプチドまたはその塩の製造方法。

【請求項 20】請求項 19 記載の方法により得られるペプチドのアミノ酸配列を含有する動物由来蛋白質またはその塩。

【請求項 21】配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質またはその塩。

【請求項 22】配列番号：4 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質またはその塩。

【請求項 23】請求項 20～22 のいずれかに記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項 24】請求項 19 記載の方法により得られるペプチド、請求項 20～22 のいずれかに記載の蛋白質もしくは請求項 23 記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

【請求項 25】請求項 1～16 のいずれかに記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むヌクレオチド。

【請求項 26】請求項 19 記載の方法により得られるペプチド、請求項 20～22 のいずれかに記載の蛋白質もしくは請求項 23 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 27】請求項 1～16 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

【請求項 28】請求項 24 記載の抗体を含有してなる医薬。

【請求項 29】請求項 25 記載のヌクレオチドを含有してなる医薬。

【請求項 30】脂肪細胞の分化または代謝機能の異常が関与する疾患の予防・治療剤である請求項 26～29 のいずれかに記載の医薬。

【請求項 31】請求項 1～16 のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたはその一部を含むヌクレオチドを含有してなる診断薬。

【請求項 3 2】請求項 2 4 記載の抗体を含有してなる診断薬。

【請求項 3 3】請求項 2 5 記載のヌクレオチドを含有してなる診断薬。

【請求項 3 4】脂肪細胞の分化または代謝機能の異常が関与する疾患の診断用である請求項 3 1 ～ 3 3 のいずれかに記載の診断薬。

【請求項 3 5】請求項 1 9 記載の方法により得られるペプチド、請求項 2 0 ～ 2 2 のいずれかに記載の蛋白質もしくは請求項 2 3 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られうる、請求項 2 0 ～ 2 2 のいずれかに記載の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物またはその塩。

【請求項 3 6】請求項 3 5 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 3 7】請求項 1 9 記載の方法により得られるペプチド、請求項 2 0 ～ 2 2 のいずれかに記載の蛋白質もしくは請求項 2 3 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを含む、請求項 2 0 ～ 2 2 のいずれかに記載の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物またはその塩の決定方法。

【請求項 3 8】請求項 1 9 記載の方法により得られるペプチド、請求項 2 0 ～ 2 2 のいずれかに記載の蛋白質もしくは請求項 2 3 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを含む、請求項 2 0 ～ 2 2 のいずれかに記載の蛋白質またはその塩とそれに対して特異的親和性を有する化合物またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 3 9】請求項 1 9 記載の方法により得られるペプチド、請求項 2 0 ～ 2 2 のいずれかに記載の蛋白質もしくは請求項 2 3 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有する、請求項 2 0 ～ 2 2 のいずれかに記載の蛋白質またはその塩とそれに対して特異的親和性を有する化合物またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 4 0】請求項 3 8 記載のスクリーニング方法または請求項 3 9 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項 2 0 ～ 2 2 のいずれかに記載の蛋白質またはその塩とそれに対して特異的親和性を有する化合物またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

【請求項 4 1】請求項 3 8 記載のスクリーニング方法または請求項 3 9 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項 2 0 ～ 2 2 のいずれかに記載

の蛋白質またはその塩とそれに対して特異的親和性を有する化合物またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 4 2】脂肪細胞の分化または代謝機能の異常が関与する疾患の予防・治療剤である請求項 4 1 記載の医薬。

【請求項 4 3】請求項 1～16 のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする、請求項 20～22 のいずれかに記載の蛋白質の mRNA の定量方法。

【請求項 4 4】請求項 2 4 記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項 20～22 のいずれかに記載の蛋白質の定量方法。

【請求項 4 5】請求項 4 3 または 4 4 記載の定量方法を用いることを特徴とする、請求項 20～22 のいずれかに記載の蛋白質の機能が関与する疾患の診断方法。

【請求項 4 6】疾患が、脂肪細胞の分化または代謝機能の異常が関与するものである請求項 4 5 記載の診断方法。

【請求項 4 7】請求項 4 3 記載の定量方法を用いることを特徴とする、請求項 20～22 のいずれかに記載の蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 4 8】請求項 4 4 記載の定量方法を用いることを特徴とする、細胞膜もしくは細胞外液における請求項 20～22 のいずれかに記載の蛋白質の量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 4 9】請求項 4 7 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、請求項 20～22 のいずれかに記載の蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩。

【請求項 5 0】請求項 4 9 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 5 1】脂肪細胞の分化または代謝機能の異常が関与する疾患の予防・治療剤である請求項 5 0 記載の医薬。

【請求項 5 2】請求項 4 8 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、細胞膜もしくは細胞外液における請求項 20～22 のいずれかに記載の蛋白質の量を変化させる化合物またはその塩。

【請求項 5 3】請求項 5 2 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 5 4】脂肪細胞の分化または代謝機能の異常が関与する疾患の予防・治療剤である請求項 5 3 記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、マウス白色脂肪細胞由来の新規分泌もしくは膜蛋白質またはその塩およびそれをコードする DNA、並びにそれらの用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

内臓脂肪が蓄積した肥満者は糖尿病や高血圧、動脈硬化などの血管病の確率が高いことで、内臓脂肪蓄積は実際に病態を発症させる引き金となる共通の基盤と考えられる。脂肪蓄積によりおこる病態の発症には脂肪細胞がつくる蛋白質が関係している可能性が考えられるが、脂肪組織に発現する遺伝子には分泌蛋白質遺伝子の頻度が高く、その中には補体、増殖因子等の生理活性物質の遺伝子が含まれていることが示されている。このような物質 (adipocytokine と呼ばれる) は、元来脂肪細胞自身の代謝に重要な役割を果たすが、脂肪蓄積時に過剰分泌や逆に分泌不全が起こり個体全体の代謝に悪影響を及ぼす可能性が考えられる。例えば、下村は線溶系の重要な調節因子であるプラスミノゲンアクティベーターインヒビター 1 (PAI-1) が、脂肪蓄積がおこると特に内臓脂肪で著しく発現量が増加して血中濃度も増加し、血管合併症の成因のひとつとなり得ることを明らかにした。また、脂肪組織に特異的かつ高頻度に発現していた遺伝子 adipose most abundant gene transcript-1 はコラーゲン様の蛋白質 (adiponectin) をコードしており、この物質はヒトの血中に多量存在し、血管平滑筋細胞の増殖を強く抑制する作用を持っているが、肥満者では血中レベルが逆に低下しており血管病へとつながることがわかってきている。

【0003】

また、脂肪細胞は多量の脂肪を合成するとともに脂肪分解も活発に行っており、血中に脂肪酸とグリセロールを放出するが、栗山がクローニングした膜蛋白質

aquaporin adiposeは脂肪細胞でグリセロールチャネル分子として機能する可能性が示唆されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

このように脂肪細胞は様々な生理活性物質（即ち、リガンド）を分泌し、また、膜蛋白質（即ち、レセプター）を細胞表面に発現している。したがって、これらの分泌・膜蛋白質の発現もしくは生理活性を調節することによって、新規な肥満、糖尿病、血管病（例、動脈硬化）の予防・治療法が開発されることが期待される。

従来、細胞表面レセプターと生理活性物質（即ち、リガンド）との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質（即ち、リガンド）と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品に活用されてきた。従って、このように生体内での発現において重要であるばかりでなく、医薬品開発の標的ともなりうる膜レセプター蛋白質およびそのリガンド分子（例えば、分泌蛋白質）を新規に見出し、その遺伝子（例えばcDNA）をクローニングすることは、新規レセプター蛋白質の特異的リガンドや、アゴニスト、アンタゴニストを見出す、もしくは新規分泌蛋白質の特異的レセプターを見出す際に、非常に重要な手段となる。

しかし、脂肪細胞で分泌もしくは細胞表面に発現する蛋白質はその全てが見出されているわけではなく、現時点でもなお未知の分泌・膜蛋白質が多数存在しており、新たなリガンド、レセプターの探索および機能解明が切望されている。

【0005】

したがって、本発明は、肥満、糖尿病、動脈硬化などの予防・治療薬開発の有用なツール、あるいはこれらの疾患の有用な診断マーカーとなり得るような、脂肪細胞で特異的もしくは高発現している新規分泌・膜蛋白質遺伝子断片を同定することを目的とする。さらに、本発明は、該新規遺伝子断片を含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該形質転換体を培養することによる該分泌・膜蛋白質断片の製造方法、該分泌・膜蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、該分泌・膜蛋白質の発現量を変化させる化合

物、該分泌・膜蛋白質に対して特異的親和性を有する生体物質の決定方法、該特異的親和性を有する生体物質と該分泌・膜蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られる該特異的親和性を有する生体物質と該分泌・膜蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩、および該特異的親和性を有する生体物質と該分泌・膜蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）もしくは該分泌・膜蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の目的を達成すべく、高脂肪食負荷マウスの内蔵脂肪組織由来の cDNA ライブラリーを作製し、該 cDNA を N 末端の細胞外領域を欠失させた恒常的活性型 トロンボポイエチン受容体（498 位のセリンがアスパラギンに置換されている）cDNA の 5' 側に組み込んだレトロウイルス発現ライブラリーを構築、パッケージング細胞から高力価レトロウイルスを回収してマウスプロ B 細胞株（Ba/F3）を感染させ、増殖性を保持した細胞を選択した。選択された細胞からゲノム DNA を抽出、PCR 法を用いて導入されたマウス脂肪細胞由来 cDNA をサブクローニングし、その塩基配列を決定した。その結果、9 つの未知分泌もしくは膜蛋白質遺伝子が同定された。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち、本発明は、

[1] 以下の (a) ~ (c) のいずれかのポリヌクレオチド、

(a) 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド

(b) 配列番号：1 で表わされる塩基配列中、塩基番号 189 ~ 812 で示される塩基配列からなるポリヌクレオチド

(c) 上記 (b) のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブ

リダイズし得る塩基配列を含み、且つ配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド

[2] 以下の (a) ~ (c) のいずれかのポリヌクレオチド、

(a) 配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド

(b) 配列番号：3で表わされる塩基配列中、塩基番号24~572で示される塩基配列からなるポリヌクレオチド

(c) 上記 (b) のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含み、且つ配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド

[3] 以下の (a) または (b) のポリヌクレオチド、

(a) FERM BP-8105株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド

(b) 上記 (a) のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含み、且つ上記 (a) のポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド

[4] (a) 記載のポリヌクレオチドが、配列番号：5で表わされる塩基配列からなる上記 [3] 記載のポリヌクレオチド、

[5] 以下の (a) または (b) のポリヌクレオチド、

(a) FERM BP-8107株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド

(b) 上記 (a) のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含み、且つ上記 (a) のポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド

[6] (a) 記載のポリヌクレオチドが、配列番号：9で表わされる塩基配列か

らなる上記 [5] のポリヌクレオチド、

[7] 以下の (a) または (b) のポリヌクレオチド、

(a) FERM BP-8108 株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド

(b) 上記 (a) のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含み、且つ上記 (a) のポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド

[8] (a) 記載のポリヌクレオチドが、配列番号: 11 で表わされる塩基配列からなる上記 [7] 記載のポリヌクレオチド、

[9] 以下の (a) または (b) のポリヌクレオチド、

(a) FERM BP-8103 株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド

(b) 上記 (a) のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含み、且つ上記 (a) のポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド

[10] (a) 記載のポリヌクレオチドが、配列番号: 14 で表わされる塩基配列からなる上記 [9] 記載のポリヌクレオチド、

[11] 以下の (a) または (b) のポリヌクレオチド、

(a) FERM BP-8104 株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド

(b) 上記 (a) のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含み、且つ上記 (a) のポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド

[12] (a) 記載のポリヌクレオチドが、配列番号: 17 で表わされる塩基配列からなる上記 [11] 記載のポリヌクレオチド、

[13] 以下の (a) または (b) のポリヌクレオチド、

(a) FERM BP-8102株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド

(b) 上記(a)のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含み、且つ上記(a)のポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド

[14] (a) 記載のポリヌクレオチドが、配列番号: 20で表わされる塩基配列からなる上記[13]のポリヌクレオチド、

[15] 以下の(a)または(b)のポリヌクレオチド、

(a) FERM BP-8110株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド

(b) 上記(a)のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含み、且つ上記(a)のポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド

[16] (a) 記載のポリヌクレオチドが、配列番号: 23で表わされる塩基配列からなる上記[15]記載のポリヌクレオチド、

[17] 所定の宿主細胞内で機能的なプロモーターの制御下にある上記[1] ~

[16]のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター、

[18] 上記[17]記載の発現ベクターを導入された宿主細胞、

[19] 上記[18]記載の細胞を培地中で培養し、得られる培養物から上記[1] ~ [16]のいずれかに記載のポリヌクレオチドによりコードされるペプチドまたはその塩を回収することを含む、該ペプチドまたはその塩の製造方法、

[20] 上記[19]記載の方法により得られるペプチドのアミノ酸配列を含有する動物由来蛋白質またはその塩、

[21] 配列番号: 2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質またはその塩、

[22] 配列番号: 4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む蛋白質またはその塩、

[23] 上記[20]～[22]のいずれかに記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、

[24] 上記[19]記載の方法により得られるペプチド、上記[20]～[22]のいずれかに記載の蛋白質もしくは上記[23]記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

[25] 上記[1]～[16]のいずれかに記載のポリヌクレオチドもしくはプロセッシングの結果として該ポリヌクレオチドを生じる初期転写産物と相補的な塩基配列またはその一部を含むヌクレオチド、

[26] 上記[19]記載の方法により得られるペプチド、上記[20]～[22]のいずれかに記載の蛋白質もしくは上記[23]記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

[27] 上記[1]～[16]のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

[28] 上記[24]記載の抗体を含有してなる医薬、

[29] 上記[25]記載のヌクレオチドを含有してなる医薬、

[30] 脂肪細胞の分化または代謝機能の異常が関与する疾患の予防・治療剤である上記[26]～[29]のいずれかに記載の医薬、

[31] 上記[1]～[16]のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたはその一部を含むヌクレオチドを含有してなる診断薬、

[32] 上記[24]記載の抗体を含有してなる診断薬、

[33] 上記[25]記載のヌクレオチドを含有してなる診断薬、

[34] 脂肪細胞の分化または代謝機能の異常が関与する疾患の診断用である上記[31]～[33]のいずれかに記載の診断薬、

[35] 上記[19]記載の方法により得られるペプチド、上記[20]～[22]のいずれかに記載の蛋白質もしくは上記[23]記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られうる、上記[20]～[22]のいずれかに記載の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物またはその塩、

[36] 上記[35]記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

[37] 上記[19]記載の方法により得られるペプチド、上記[20]～[22]

2] のいずれかに記載の蛋白質もしくは上記 [23] 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを含む、上記 [20] ~ [22] のいずれかに記載の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物またはその塩の決定方法、

[38] 上記 [19] 記載の方法により得られるペプチド、上記 [20] ~ [22] のいずれかに記載の蛋白質もしくは上記 [23] 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを含む、上記 [20] ~ [22] のいずれかに記載の蛋白質またはその塩とそれに対して特異的親和性を有する化合物またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

[39] 上記 [19] 記載の方法により得られるペプチド、上記 [20] ~ [22] のいずれかに記載の蛋白質もしくは上記 [23] 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有する、上記 [20] ~ [22] のいずれかに記載の蛋白質またはその塩とそれに対して特異的親和性を有する化合物またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

[40] 上記 [38] 記載のスクリーニング方法または上記 [39] 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記 [20] ~ [22] のいずれかに記載の蛋白質またはその塩とそれに対して特異的親和性を有する化合物またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

[41] 上記 [38] 記載のスクリーニング方法または上記 [39] 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記 [20] ~ [22] のいずれかに記載の蛋白質またはその塩とそれに対して特異的親和性を有する化合物またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

[42] 脂肪細胞の分化または代謝機能の異常が関与する疾患の予防・治療剤である上記 [41] 記載の医薬、

[43] 上記 [1] ~ [16] のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする、上記 [20] ~ [22] のいずれかに記載の蛋白質の mRNA の定量方法、

[44] 上記 [24] 記載の抗体を用いることを特徴とする、上記 [20] ~ [22] のいずれかに記載の蛋白質の定量方法、

[45] 上記 [43] または [44] 記載の定量方法を用いることを特徴とする

、上記〔20〕～〔22〕のいずれかに記載の蛋白質の機能が関与する疾患の診断方法、

〔46〕疾患が、脂肪細胞の分化または代謝機能の異常が関与するものである上記〔45〕記載の診断方法、

〔47〕上記〔43〕記載の定量方法を用いることを特徴とする、上記〔20〕～〔22〕のいずれかに記載の蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

〔48〕上記〔44〕記載の定量方法を用いることを特徴とする、細胞膜もしくは細胞外液における上記〔20〕～〔22〕のいずれかに記載の蛋白質の量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

〔49〕上記〔47〕記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、上記〔20〕～〔22〕のいずれかに記載の蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩、

〔50〕上記〔49〕記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

〔51〕脂肪細胞の分化または代謝機能の異常が関与する疾患の予防・治療剤である上記〔50〕記載の医薬、

〔52〕上記〔48〕記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、細胞膜もしくは細胞外液における上記〔20〕～〔22〕のいずれかに記載の蛋白質の量を変化させる化合物またはその塩、

〔53〕上記〔52〕記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、および

〔54〕脂肪細胞の分化または代謝機能の異常が関与する疾患の予防・治療剤である上記〔53〕記載の医薬などを提供する。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明は、高脂肪食負荷されたヒトまたは他の哺乳動物の白色脂肪細胞組織で特異的にもしくは高発現する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチド（以下、本発明のポリヌクレオチドともいう）を提供する。具体的には、本発明のポリヌクレオチドは、大腸菌（エシェリヒア・コリ）株 *Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (20-6)、*Escherichia coli* Top10/pENTR

/D-TOP0 (22-22)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOP0 (9-8)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOP0 (13-11)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOP0 (19-15)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOP0 (19-20)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOP0 (20-14)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOP0 (21-3)またはEscherichia coli Top10/pENTR/D-TOP0 (8-5)に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチドと同一もしくは実質的に同一のポリヌクレオチドである。Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOP0 (20-6)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOP0 (22-22)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOP0 (9-8)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOP0 (13-11)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOP0 (19-15)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOP0 (19-20)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOP0 (20-14)、Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOP0 (21-3)およびEscherichia coli Top10/pENTR/D-TOP0 (8-5)株は、それぞれFERM BP-8106、FERM BP-8109、FERM BP-8105、FERM BP-8107、FERM BP-8108、FERM BP-8103、FERM BP-8104、FERM BP-8102およびFERM BP-8110の受託番号を付され、平成14年7月2日付で独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6）に寄託されている。

ここで「実質的に同一」とは、上記いずれかのマウス由来ポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、且つ該ポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードすることを意味する。「同質の生理活性」としては、分泌蛋白質（例、ホルモン、サイトカインなど）であれば、レセプター結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられ、膜蛋白質（例、ホルモンレセプター、サイトカインレセプターなど）であれば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。「実質的に同質」とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、レセプター（リガンド）結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

レセプター（リガンド）結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述する特異的親和性を有する生体物質（レセプター、リガンド）の決定方法やアゴニスト・アンタゴニストのスクリーニング方法に従って測定することができる。

【0009】

Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOPO (20-6)細胞株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド（以下、mSst20-6という）は配列番号：1で表される塩基配列からなり、このうち塩基番号189～812で示される塩基配列が配列番号：2で表されるアミノ酸配列をコードする。したがって、mSst20-6と実質的に同一のポリヌクレオチド（以下、Sst20-6と総称する）とは、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、あるいは配列番号：1で表される塩基配列中、塩基番号189～812で示される塩基配列（以下、塩基配列1という）からなるポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基配列1にコードされる蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチドである。「同質の生理活性」、「実質的に同質」とは上記と同様の意味であり、該生理活性の測定方法も上述の通り行うことができる。

「アミノ酸配列と実質的に同一」とは、該アミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、あるいは該アミノ酸配列において1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加したアミノ酸配列、またはそれらを組み合わせたアミノ酸配列を含み、且つ塩基配列1にコードされる蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部であることをいう。

塩基配列1からなるポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるポリヌクレオチドとしては、例えば、塩基配列1と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約

95%以上の同一性を有する塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが挙げられる。該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40mM、好ましくは約19～20mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd Edition (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

【0010】

Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOPO (22-22)細胞株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド（以下、mSst22-22という）は配列番号：3で表される塩基配列からなり、このうち塩基番号24～572で示される塩基配列が配列番号：4で表されるアミノ酸配列をコードする。したがって、mSst22-22と実質的に同一のポリヌクレオチド（以下、Sst22-22と総称する）とは、配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、あるいは配列番号：3で表される塩基配列中、塩基番号24～572で示される塩基配列（以下、塩基配列3という）からなるポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基配列3にコードされる蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチドである。「同質の生理活性」、「実質的に同一」、「アミノ酸配列と実質的に同一」、「ハイストリンジェントな条件」、「ハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるポリヌクレオチド」とは、それぞれ上記Sst20-6の場合と同様の意味である。

【0011】

Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOPO (9-8)細胞株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド（以下、mSst9-8という）は配列番号：5で表

される塩基配列からなり、配列番号6～8に示されるいずれかのアミノ酸配列を含む分泌もしくは膜蛋白質をコードするものと推定される。したがって、mSst9-8と実質的に同一のポリヌクレオチド（以下、Sst9-8と総称する）とは、配列番号：5で表される塩基配列の蛋白質コード領域（以下、塩基配列5という）からなるポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基配列5にコードされる蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチドである。「同質の生理活性」、「実質的に同質」、「ハイストリンジェントな条件」、「ハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるポリヌクレオチド」とは、それぞれ上記Sst20-6の場合と同様の意味である。

Sst9-8に対応する遺伝子は、白色脂肪だけでなく褐色脂肪組織においても発現する。

【0012】

Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOP0 (13-11)細胞株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド（以下、mSst13-11という）は配列番号：9で表される塩基配列からなり、配列番号10に示されるアミノ酸配列を含む分泌もしくは膜蛋白質をコードするものと推定される。したがって、mSst13-11と実質的に同一のポリヌクレオチド（以下、Sst13-11と総称する）とは、配列番号：9で表される塩基配列の蛋白質コード領域（以下、塩基配列9という）からなるポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基配列9にコードされる蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチドである。「同質の生理活性」、「実質的に同質」、「ハイストリンジェントな条件」、「ハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるポリヌクレオチド」とは、それぞれ上記Sst20-6の場合と同様の意味である。

Sst13-11に対応する遺伝子は、白色脂肪だけでなく褐色脂肪組織においても発現する。また、該遺伝子は、高脂肪-高スクロース負荷マウス、肥満モデルマウス (ob/ob)において、それぞれ対照マウスと比較して発現量が変動しており、さらに、絶食または絶食・再給餌により発現量が変動する。

【0013】

Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOPO (19-15)細胞株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド（以下、mSst19-15という）は配列番号：11で表される塩基配列からなり、配列番号12または13に示されるアミノ酸配列を含む分泌もしくは膜蛋白質をコードするものと推定される。したがって、mSst19-15と実質的に同一のポリヌクレオチド（以下、Sst19-15と総称する）とは、配列番号：11で表される塩基配列の蛋白質コード領域（以下、塩基配列11という）からなるポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基配列11にコードされる蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチドである。「同質の生理活性」、「実質的に同質」、「ハイストリンジェントな条件」、「ハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるポリヌクレオチド」とは、それぞれ上記Sst20-6の場合と同様の意味である。

Sst19-15に対応する遺伝子は、白色脂肪だけでなく褐色脂肪組織においても発現する。また、該遺伝子は、絶食または絶食・再給餌により発現量が変動する。

【0014】

Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOPO (19-20)細胞株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド（以下、mSst19-20という）は配列番号：14で表される塩基配列からなり、配列番号15または16に示されるアミノ酸配列を含む分泌もしくは膜蛋白質をコードするものと推定される。したがって、mSst19-20と実質的に同一のポリヌクレオチド（以下、Sst19-20と総称する）とは、配列番号：14で表される塩基配列の蛋白質コード領域（以下、塩基配列14という）からなるポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基配列14にコードされる蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチドである。「同質の生理活性」、「実質的に同質」、「ハイストリンジェントな条件」、「ハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるポリヌクレオチド」とは、それぞれ上記Sst20-6の場合と同様の意味である。

Sst19-20に対応する遺伝子は、白色脂肪だけでなく褐色脂肪組織においても発

現する。また、該遺伝子は、絶食または絶食・再給餌により発現量が変動する。

【0015】

Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOPO (20-14)細胞株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド（以下、mSst20-14という）は配列番号：17で表される塩基配列からなり、配列番号18または19に示されるアミノ酸配列を含む分泌もしくは膜蛋白質をコードするものと推定される。したがって、mSst20-14と実質的に同一のポリヌクレオチド（以下、Sst20-14と総称する）とは、配列番号：17で表される塩基配列の蛋白質コード領域（以下、塩基配列17という）からなるポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基配列17にコードされる蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチドである。該蛋白質コード領域はリポ蛋白質の脂質に結合し得るモチーフを有している。「同質の生理活性」、「実質的に同質」、「ハイストリンジェントな条件」、「ハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるポリヌクレオチド」とは、それぞれ上記Sst20-6の場合と同様の意味である。

Sst20-14に対応する遺伝子は、絶食または絶食・再給餌により発現量が変動する。

【0016】

Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOPO (21-3)細胞株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド（以下、mSst21-3という）は配列番号：20で表される塩基配列からなり、配列番号21または22に示されるいずれかのアミノ酸配列を含む分泌もしくは膜蛋白質をコードするものと推定される。したがって、mSst20-14と実質的に同一のポリヌクレオチド（以下、Sst21-3と総称する）とは、配列番号：20で表される塩基配列の蛋白質コード領域（以下、塩基配列20という）からなるポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基配列20にコードされる蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチドである。「同質の生理活性」、「実質的に同質」、「ハイストリンジェントな条件」、「ハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズでき

るポリヌクレオチド」とは、それぞれ上記Sst20-6の場合と同様の意味である。

Sst21-3に対応する遺伝子は、白色脂肪だけでなく褐色脂肪組織においても発現する。また、該遺伝子は、糖尿病モデルマウス (db/db) において対照マウスと比較して発現量が変動しており、さらに、絶食または絶食・再給餌により発現量が変動する。また、該遺伝子は、未分化な前駆白色脂肪細胞 (3T3-L1) においても発現する。

【0017】

Escherichia coli Top10/pENTR/D-TOPO (8-5)細胞株に保持されるマウス白色脂肪細胞由来のポリヌクレオチド (以下、mSst8-5という) は配列番号: 23で表される塩基配列からなり、配列番号24または25に示されるアミノ酸配列を含む分泌もしくは膜蛋白質をコードするものと推定される。したがって、mSst8-5と実質的に同一のポリヌクレオチド (以下、Sst8-5と総称する) とは、配列番号: 23で表される塩基配列の蛋白質コード領域 (以下、塩基配列23という) からなるポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基配列23にコードされる蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードするポリヌクレオチドである。「同質の生理活性」、「実質的に同質」、「ハイストリンジェントな条件」、「ハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるポリヌクレオチド」とは、それぞれ上記Sst20-6の場合と同様の意味である。

【0018】

本発明のポリヌクレオチドは、前述した要件を具備するものであれば、DNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。好ましくはDNAが挙げられる。また、該ポリヌクレオチドは二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖 (即ち、コード鎖) であっても、アンチセンス鎖 (即ち、非コード鎖) であってもよい。本発明のDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、ヒトまたは他の哺乳動物 (例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど) のあらゆる細胞 (例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞

、脾臓β細胞、骨髓細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳幹、黒質）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など（特に、脳や脳の各部位）由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミド、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

【0019】

本発明のポリヌクレオチドの塩基配列の一部、または該ポリヌクレオチドと相補的な塩基配列の一部を含有してなるヌクレオチドとは、後述の本発明の分泌もしくは膜蛋白質の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけではなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

目的核酸の標的領域と相補的な塩基配列を含むヌクレオチド、即ち、目的核酸とハイブリダイズすることができるヌクレオチドは、該目的核酸に対して「アンチセンス」であるということができる。一方、目的核酸の標的領域と相同性を有する塩基配列を含むヌクレオチド（即ち、目的核酸が蛋白質をコードする場合、その蛋白質の部分ペプチドをコードするヌクレオチド）は、該目的核酸に対して

「センス」であるということができる。本明細書で用いる用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ここで「相同性を有する」または「相補的である」とは、塩基配列間で約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性または相補性を有することをいう。また、ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、そのペプチド（蛋白質）がヌクレオチド（核酸）またはその相補体の配列から翻訳されるアミノ酸配列を有することを通常指している。

【0020】

本発明のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列の一部を含有してなるヌクレオチド（以下、本発明のアンチセンスヌクレオチドともいう）は、クローン化した、あるいは決定された本発明のポリヌクレオチドの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドの塩基配列を含む遺伝子の複製または発現を阻害することができる。例えば、Sst20-6のアンチセンスヌクレオチドは、Sst20-6に対応する遺伝子から転写されるRNAとハイブリダイズすることができ、mRNAの合成（プロセッシング）または機能（蛋白質への翻訳）を阻害することができるか、あるいはSst20-6関連RNAとの相互作用を介してSst20-6に対応する遺伝子の発現を調節・制御することができる。Sst20-6関連RNAの選択された配列に相補的なヌクレオチド、およびSst20-6関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるヌクレオチドは、生体内および生体外でSst20-6に対応する遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。

【0021】

本発明のアンチセンスヌクレオチドの標的領域は、アンチセンスヌクレオチドがハイブリダイズすることにより、結果として本発明のポリヌクレオチドに対応する蛋白質の翻訳が阻害されるものであればその長さに特に制限はなく、本発明のポリヌクレオチドに対応するmRNAの全配列であっても部分配列であってもよく、短いもので約15塩基程度、長いものでmRNAまたは初期転写産物の全

配列が挙げられる。合成の容易さや抗原性の問題を考慮すれば、約15～約30塩基からなるオリゴヌクレオチドが好ましいがそれに限定されない。具体的には、例えば、本発明のポリヌクレオチドの5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、および3'端ヘアピンループが標的領域として選択しうるが、本発明のポリヌクレオチドに対応する遺伝子内の如何なる領域も標的として選択しうる。例えば、該遺伝子のイントロン部分を標的領域とすることもまた好ましい。

さらに、本発明のアンチセンスヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドに対応するmRNAもしくは初期転写産物とハイブリダイズして蛋白質への翻訳を阻害するだけでなく、二本鎖DNAである本発明のポリヌクレオチドに対応する遺伝子と結合して三重鎖（トリプレックス）を形成し、RNAの転写を阻害し得るものであってもよい。

【0022】

アンチセンスヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有しているリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート

、ホスホロジチオエートなど)を持つもの、例えば蛋白質(ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーLーリジンなど)や糖(例えば、モノサッカライドなど)などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物(例えば、アクリジン、プソラレンなど)を持つもの、キレート化合物(例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など)を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの(例えば、 α アノマー型の核酸など)であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

【0023】

アンチセンスヌクレオチドは、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸(RNA、DNA)である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

【0024】

アンチセンスヌクレオチドは、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リボゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3' 端あるいは5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3' 端あるいは5' 端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

【0025】

本発明のポリヌクレオチドに対応するmRNAもしくは遺伝子の初期転写産物を、コード領域の内部（初期転写産物の場合はイントロン部分を含む）で特異的に切断し得るリボザイムもまた、本発明のアンチセンスヌクレオチドに包含され得る。「リボザイム」とは核酸を切断する酵素活性を有するRNAをいうが、最近では当該酵素活性部位の塩基配列を有するオリゴDNAも同様に核酸切断活性を有することが明らかになっているので、本明細書では配列特異的な核酸切断活性を有する限りDNAをも包含する概念として用いるものとする。リボザイムとして最も汎用性の高いものとしては、ウイロイドやウイルソイド等の感染性RNAに見られるセルフスプライシングRNAがあり、ハンマーヘッド型やヘアピン型等が知られている。ハンマーヘッド型は約40塩基程度で酵素活性を発揮し、ハンマーヘッド構造をとる部分に隣接する両端の数塩基ずつ（合わせて約10塩基程度）をmRNAの所望の切断部位と相補的な配列にすることにより、標的m

RNAのみを特異的に切断することが可能である。このタイプのリボザイムは、RNAのみを基質とするので、ゲノムDNAを攻撃することがないというさらなる利点を有する。本発明のポリヌクレオチドに対応するmRNAが自身で二本鎖構造をとる場合には、RNAヘリカーゼと特異的に結合し得るウイルス核酸由来のRNAモチーフを連結したハイブリッドリボザイムを用いることにより、標的配列を一本鎖にすることができる [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(10): 5572-5577 (2001)]。さらに、リボザイムを、それをコードするDNAを含む発現ベクターの形態で使用する場合には、転写産物の細胞質への移行を促進するために、tRNAを改変した配列をさらに連結したハイブリッドリボザイムとすることもできる [Nucleic Acids Res., 29(13): 2780-2788 (2001)]。

【0026】

本発明のポリヌクレオチドに対応するmRNAもしくは遺伝子の初期転写産物のコード領域内の部分配列（初期転写産物の場合はイントロン部分を含む）に相補的な二本鎖オリゴRNAもまた、本発明のアンチセンスヌクレオチドに包含され得る。短い二本鎖RNAを細胞内に導入するとそのRNAに相補的なmRNAが分解される、いわゆるRNA干渉（RNAi）と呼ばれる現象は、以前から線虫、昆虫、植物等で知られていたが、最近、この現象が哺乳動物細胞でも起こることが確認されたことから [Nature, 411(6836): 494-498 (2001)]、リボザイムの代替技術として注目されている。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド及びリボザイムは、本発明のポリヌクレオチドに対応するcDNA配列もしくはゲノミックDNA配列情報に基づいてmRNAもしくは初期転写産物の標的領域を決定し、市販のDNA/RNA自動合成機（アプライド・バイオシステムズ社、ベックマン社等）を用いて、これに相補的な配列を合成することにより調製することができる。RNAi活性を有する二本鎖オリゴRNAは、センス鎖及びアンチセンス鎖をDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、適当なアニーリング緩衝液中で、例えば、約90～約95℃で約1分程度変性させた後、約30～約70℃で約1～約8時間アニーリングさせることにより調製することができる。また、相補的なオリゴヌクレオチド鎖を交互にオーバーラップするように合成して、これらをアニーリングさせた

後リガーゼでライゲーションすることにより、より長い二本鎖ポリヌクレオチドを調製することもできる。

【0027】

本発明のアンチセンスヌクレオチドの遺伝子発現阻害活性は、本発明のポリヌクレオチドを含有する形質転換体、生体内や生体外の本発明のポリヌクレオチド発現系または本発明のポリヌクレオチドに対応する分泌・膜蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

【0028】

本発明のポリヌクレオチドの一部を含むヌクレオチドとしては、上記した本発明のポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列（即ち、塩基配列1、3、5、9、11、14、17、20もしくは23にコードされるアミノ酸配列またはそれらと実質的に同一のアミノ酸配列）を含む蛋白質の部分ペプチド（以下、本発明の部分ペプチドともいう）をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

【0029】

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするヌクレオチドとしては、例えば、（1）塩基配列1、3、5、9、11、14、17、20もしくは23を有するポリヌクレオチドの部分塩基配列を有するヌクレオチド、または（2）塩基配列1、3、5、9、11、14、17、20もしくは23を有するポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、該ポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の活性（例、リガンド（レセプター）結合活性、シグナル伝達作用など）を有する

分泌・膜蛋白質をコードするポリヌクレオチドの部分塩基配列を有するヌクレオチドなどが用いられる。

塩基配列 1、3、5、9、11、14、17、20 もしくは 23 とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるポリヌクレオチドとしては、例えば、各塩基配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の同一性を有する塩基配列を含有するポリヌクレオチドなどが用いられる。

【0030】

本発明のポリヌクレオチドは、ヒトまたは他の哺乳動物の白色脂肪細胞で、特に高脂肪食負荷により高発現する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部をコードしている。分泌もしくは膜蛋白質をコードするポリヌクレオチドをクローニングする簡便な手法としてシグナルシーケンストラップ (SST) 法が知られている。この方法は、基本的には、目的の組織由来の cDNA ライブラリーを複製し、これを分泌もしくは細胞膜へ移行した場合にのみ細胞の選択を可能にする蛋白質をコードする DNA の 5' 側に組み込んだ融合蛋白質発現ベクターを用い、該蛋白質の分泌もしくは細胞膜への移行を指標にして分泌もしくは膜蛋白質をコードする cDNA を選択するというものである。例えば、スクロースを資化できない変異インペルターゼを有する酵母に、目的 cDNA ライブラリーをシグナル配列欠失変異インペルターゼ遺伝子の 5' 側に融合させた酵母発現プラスミドを導入し、スクロースを炭素源とする培地で増殖性を有する酵母を選択する方法 (Klein ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 7108-7113, 1996)、シグナル欠損変異 CD25 抗原遺伝子の 5' 側に目的 cDNA ライブラリーを融合させた哺乳動物用発現ベクターを適当な哺乳動物細胞に導入し、抗 CD25 抗体を用いた免疫染色により分泌・膜蛋白質をコードする cDNA を有するクローンを選択する方法 (Tashiro ら, Science, 261: 600-603, 1993)、Ba/F3 細胞株を IL-3 非依存的に増殖可能にする変異トロンボポイエチン受容体 (N 末端細胞外ドメインコード領域を欠失する) の 5' 側に目的 cDNA ライブラリーを融合させた哺乳動物用発現ベクターを Ba/F3 細胞に導入し、IL-3 非存在下で増殖性を有する細胞を選択する方法 (Kojima および Kitamura, Nature Biotech., 17:

487-490, 1999; Tsurugaら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 272: 293-297, 2000) 等が挙げられる。

【0031】

選択された細胞からゲノムDNA (導入されたcDNAがゲノムに組み込まれている場合) またはプラスミドDNAもしくはウイルスDNA (導入されたcDNAがゲノムに組み込まれていない場合) を抽出し、使用したベクターの5' フランキング配列と融合させたマーカー蛋白質遺伝子の5' 側配列を基にしてプライマーを作製し、PCR法を行うことにより分泌もしくは膜蛋白質をコードするcDNAを単離し、適当なクローニングベクター中にサブクローニングすることができる。

こうして得られたcDNAの塩基配列は自体公知の方法 (マキサム・ギルバート法、ジデオキシターミネーション法等) を用いて決定することができる。

【0032】

上記の方法によりクローニングされ、配列決定された分泌もしくは膜蛋白質の一部をコードするcDNAに対応する遺伝子が脂肪細胞で特定のストレス (例、高脂肪食ストレス) 条件下に高発現するか否かは、クローニングされたcDNAをそのまま、もしくは決定された塩基配列に基づいて該cDNAの一部を合成したものをプローブとして、ストレス条件下および非ストレス条件下における脂肪細胞由来RNAのノーザンブロット分析を行うか、あるいは合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして定量的RT-PCRを実施することにより、同定することができる。

【0033】

本発明のポリヌクレオチドまたは本発明の部分ペプチドをコードするヌクレオチドのクローニングの手段としては、上記のようにして同定され、配列決定された本発明のポリヌクレオチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリヌクレオチドの一部あるいは全領域を含むDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニ

ング (Molecular Cloning) 2nd Edition (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。ライブラリーから再度ハイブリダイゼーションによって選別することにより、本発明のポリヌクレオチドにコードされるアミノ酸配列を含む分泌もしくは膜蛋白質の完全長 cDNA をクローニングすることもできる。

【0034】

DNA の塩基配列の変換は、PCR や公知のキット、例えば、MutanTM-super Express KmG (宝酒造 (株))、MutanTM-K (宝酒造 (株)) などを用いて、ODA-LA PCR 法、Gapped duplex 法、Kunkel 法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化された本発明のポリヌクレオチドは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該ヌクレオチドはその 5' 末端側に翻訳開始コドンとしての ATG を有し、また 3' 末端側には翻訳終止コドンとしての TAA、TGA または TAG を有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成 DNA アダプターを用いて付加することもできる。SST 法を用いてクローニングされる本発明のポリヌクレオチドは、通常翻訳終止コドンを有しないので、この場合は本発明のポリヌクレオチドの発現ベクターを作製する際、翻訳終止コドンを付加することが好ましい。

【0035】

本発明のポリヌクレオチドの発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のポリヌクレオチドを含む断片を切り出し、(ロ) ポリヌクレオチド断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19、pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、p

Rc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。

プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr⁻）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリヌクレオチドにネイティブなシグナル配列に代えてN末端側に付加することもできる。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナ

ル配列などがそれぞれ利用できる。

【0036】

このようにして構築された本発明のポリヌクレオチドを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクイレック・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン (Gene), 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D、20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞)

などが用いられる。該 S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL1711)、S f 2 1 細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo) , 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature) , 3 1 5 巻, 5 9 2 (1 9 8 5)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞 C O S - 7, Vero, チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O 細胞と略記)、d h f r 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O (d h f r -) 細胞と略記)、マウス L 細胞、マウス A t T - 2 0、マウスミエローマ細胞、ラット G H 3、ヒト F L 細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 6 9 巻, 2 1 1 0 (1 9 7 2) やジーン (Gene) , 1 7 巻, 1 0 7 (1 9 8 2) などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 1 6 8 巻, 1 1 1 (1 9 7 9) などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メツソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) , 1 9 4 巻, 1 8 2 - 1 8 7 (1 9 9 1)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 7 5 巻, 1 9 2 9 (1 9 7 8) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology) , 6 巻, 4 7 - 5 5 (1 9 8 8) などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコル, 2 6 3 - 2 6 7 (1 9 9 5) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology) , 5 2 巻, 4 5 6 (1 9 7 3) に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターで形質転

換された形質転換体が得られる。

【0037】

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] が挙げら

れる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195巻, 788 (1962)) に非働化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], DMEM培地〔ウイルス学 (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞膜または細胞外に本発明のポリヌクレオチドにコードされる分泌・膜蛋白質のペプチド断片を生成せしめることができる。

【0038】

上記培養物から生成したペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

該ペプチドが膜結合型である場合、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により膜画分を沈澱させる。次いで、膜画分をトリトンX-100 TMなどの界面活性剤を用いて破壊し、遠心分離して上清を回収する。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤が含まれていてもよい。該ペプチドが培養液中に分泌される

場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは膜可溶化画分中に含まれる該ペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られるペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成するペプチドまたはその塩の活性は、標識したリガンド（レセプター）との結合実験および特異的抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0039】

本発明はまた、上記の方法により得られる本発明のポリヌクレオチドにコードされる分泌・膜蛋白質のペプチド断片またはその塩を提供する。さらに本発明は、そのようなペプチド断片を部分アミノ酸配列として含む、動物由来の分泌・膜蛋白質（以下、本発明の蛋白質ともいう）またはその塩を提供する。

本発明の蛋白質は、上記の通り、本発明のポリヌクレオチドまたはその部分ヌ

クレオチドをプローブとして、ヒトまたは他の哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓 β 細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳室、黒質）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など（特に、脳や脳の各部位）に由来するcDNAライブラリーからハイブリダイゼーション法を用いてクローニングされる、本発明の蛋白質の完全長をコードするcDNAを、上述のような発現ベクター中に挿入し、適当な宿主細胞内で発現させて当該細胞の培養物から回収する方法により、採取することができる。

また、本発明の蛋白質は、後述する本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に特異的親和性を有する抗体を用いて、前記した細胞・組織の膜画分もしくは細胞外液からアフィニティークロマトグラフィーにより分離精製することもできる。

【0040】

具体的には、本発明のポリヌクレオチド（特にSst20-6およびSst22-22）にコードされる分泌・膜蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩は、配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含む。「実質的に同一」とは、該アミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、あるいは該アミノ酸配列において1ま

たは2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加したアミノ酸配列、またはそれらを組み合わせたアミノ酸配列を含み、且つ配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する分泌もしくは膜蛋白質の一部もしくは全部であることをいう。「実質的に同質の生理活性」とは、例えば、リガンド（レセプター）結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。「実質的に同質」とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド（レセプター）結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リガンド（レセプター）結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述する特異的親和性を有する生体物質（レセプター、リガンド）の決定方法やアゴニスト・アンタゴニストのスクリーニング方法が挙げられる。

【0041】

本発明の蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を含有する分泌・膜蛋白質をはじめとする、本発明の蛋白質は、C末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であつてもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステ

ルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明の蛋白質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の蛋白質には、上記した蛋白質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂—6アルカノイル基などのC₁—6アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、—OH、—SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂—6アルカノイル基などのC₁—6アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明の蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列を含有するマウス由来（より好ましくはマウス白色脂肪細胞由来）の蛋白質などが用いられる。

【0042】

本発明の蛋白質の部分ペプチド（以下、本発明の部分ペプチドと略記する場合がある）としては、前記した本発明の蛋白質の部分アミノ酸配列もしくはそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチドであれば何れのものであってもよいが、本発明の蛋白質と実質的に同質の生理活性を有する部分ペプチド、例えば、本発明の蛋白質が膜レセプター蛋白質の場合、細胞膜の外に露出している部位であって、リガンドとの結合活性を有するものなどが用いられる。また、本発明の蛋白質が分泌蛋白質（例、ホルモン、サイトカイン）の場合、レセプターとの結合活性を有するものなどが用いられる。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記した本発明の蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質の生理活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質の生理活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。

【0043】

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、前記した本発明の蛋白質のごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明の蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、前記した本発明の蛋白質のごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸

、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

【0044】

本発明の蛋白質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述の蛋白質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

【0045】

本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質またはそのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド

類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0046】

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

【0047】

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、

プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラルキルエステル化(例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

【0048】

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール(例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt)とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去(脱離)方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン

、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 $-20 \sim 40^{\circ}\text{C}$ の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

【0049】

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

蛋白質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（蛋白質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去した蛋白質とを製造し、この両蛋白質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質を得ることができる。この粗蛋白質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の蛋白質のアミド体を得ることができる。

蛋白質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、蛋白質のアミド体と同様にして、所望の蛋白質のエステル体を得ることができる。

【0050】

本発明の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによっ

て製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および梶原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の前製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0051】

本発明はまた、上記の本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩(以下、本発明の蛋白質等と略記する場合もある)に対する抗体を提供する。該抗体は、本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対して特異的親和性を有するものであれば、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよい。本発明の蛋白質等に対する抗体は、本発明の蛋白質等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

【0052】

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明の蛋白質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された哺乳動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化レセプター蛋白質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0053】

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、蛋白質等の抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物

質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した蛋白質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0054】

（b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

【0055】

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（蛋白質等の抗原）とキャリ

アー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明の蛋白質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、哺乳動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0056】

本発明の蛋白質またはその塩、その部分ペプチドまたはその塩、該蛋白質またはその部分ペプチドをコードするヌクレオチド（アンチセンスを含む）、および該蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体は、（1）本発明の蛋白質に対して特異的親和性を有する化合物またはその塩（本発明の蛋白質が膜レセプター蛋白質の場合にはそれに対するリガンド、分泌蛋白質（例、ホルモン、サイトカイ

ン) の場合はそれに対するレセプター) の決定、(2) 本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤、(3) 本発明の蛋白質の過剰発現に関連する疾患の予防および/または治療剤、(4) 遺伝子診断剤、(5) 本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法、(6) 本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および/または治療剤、(7) 本発明の蛋白質に対して特異的親和性を有する化合物の定量法、(8) 本発明の蛋白質と該蛋白質に対して特異的親和性を有する化合物との結合性を変化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニストなど)のスクリーニング方法、(9) 本発明の蛋白質と該蛋白質に対して特異的親和性を有する化合物との結合性を変化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニスト)を含有する各種疾病の予防および/または治療剤、(10) 本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量、(11) 細胞膜または細胞外液における本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、(12) 細胞膜または細胞外液における本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および/または治療剤、(13) 本発明の蛋白質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製、(14) 本発明の蛋白質をコードする遺伝子が不活性化されたノックアウト非ヒト動物の作製などに用いることができる。

特に、本発明の組換え型蛋白質またはその部分ペプチドの発現系を用いたアフィニティーアッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的な膜レセプターに対するリガンドまたは分泌性リガンドに対するレセプターの結合性を変化させる化合物(例、アゴニスト、アンタゴニストなど)をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明の蛋白質等、本発明の蛋白質等をコードするDNA(以下、本発明のDNAと略記する場合がある)、本発明のアンチセンスヌクレオチドおよび本発明の蛋白質等に対する抗体(以下、本発明の抗体と略記する場合がある)の用途について、以下に具体的に説明する。

【0057】

(1) 本発明の蛋白質に対して特異的親和性を有する化合物の決定

本発明の蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物を探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明の蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物の決定方法を提供する。

試験化合物としては、本発明の蛋白質が膜レセプターである場合、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテログastrin、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンなど）の他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のレセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。一方、本発明の蛋白質が分泌蛋白質である場合、試験化合物として、例えば上記リガンドに対する公知のレセプターの他に、上記と同様にヒトまたは哺乳動物の組織抽出物、無傷細胞、細胞膜画分、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、無傷細胞、細胞膜画分、細胞培養

上清などを本発明の分泌蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分離し、最終的に単一のレセプター等を得ることができる。

【0058】

具体的には、本発明の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物の決定方法は、本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いるか、または組換え型蛋白質もしくはその部分ペプチドの発現系を構築し、該発現系を用いたアフィニティーアッセイ系を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos 活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性）を有する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）、または本発明の分泌蛋白質に結合して上記の細胞刺激活性を有する化合物、あるいはそれらの塩を決定する方法である。

本発明の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物の決定方法においては、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該蛋白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

【0059】

より具体的には、本発明は、

- ①標識した試験化合物を、本発明の蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする、本発明の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物の決定方法、
- ②標識した試験化合物を、本発明の蛋白質を含有する細胞または細胞膜画分、あるいは細胞外液または細胞培養上清（この場合、例えば、上記の本発明の抗体を固定化した固相（細胞培養プレート等）を用いて分泌蛋白質を固相化する）に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞、該膜画分、該細胞外液ま

たは該細胞培養上清に対する結合量を測定することを特徴とする、本発明の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物の決定方法、

③標識した試験化合物を、本発明の蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した、または培養上清に分泌された蛋白質（この場合、例えば、上記の本発明の抗体を固定化した固相（細胞培養プレート等）を用いて分泌蛋白質を固相化する）に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質またはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする、本発明の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物の決定方法、

【0060】

④試験化合物（または試験化合物である膜蛋白質等を細胞膜上に含有する細胞）を、本発明の膜蛋白質を含有する細胞（または本発明の分泌蛋白質を生成する細胞の培養上清）に接触させた場合における、本発明の膜蛋白質（または試験化合物である膜蛋白質等）を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明の膜蛋白質（または分泌蛋白質）またはその塩に対するリガンド（またはレセプター）の決定方法、および

⑤試験化合物（または試験化合物である膜蛋白質等を細胞膜上に含有する細胞）を、本発明の膜蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した膜蛋白質（本発明の分泌蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって培養上清中に分泌された分泌蛋白質）に接触させた場合における、本発明の膜蛋白質（または試験化合物である膜蛋白質等）を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明の膜蛋白質（または分泌蛋白質）またはその塩に対するリガ

ンド（またはレセプター）の決定方法を提供する。

特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明の蛋白質に結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。

【0061】

まず、リガンド（またはレセプター）決定方法に用いる膜（または分泌）蛋白質としては、上記した本発明の膜（または分泌）蛋白質またはその部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させた蛋白質が適している。

本発明の蛋白質を製造するには、前述の発現方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現させることにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には、通常、相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明の蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス（nuclear polyhedrosis virus; NPV）のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現した蛋白質の量と質の検査はそれ自体公知の方法で行なうことができる。例えば、文献〔Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.）, 267巻, 19555～19559頁, 1992年〕に記載の方法に従って行なうことができる。

【0062】

したがって、本発明のリガンド（またはレセプター）決定方法において、本発明の膜（または分泌）蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製した膜（または分泌）蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩であってもよいし、該膜蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分、あるいは該分泌蛋白質を含有する細胞培養上清を用

いてもよい。

本発明のリガンド決定方法において、本発明の膜蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明の膜蛋白質を含有する細胞としては、本発明の膜蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約1~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm ~ 30000 rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した膜蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

【0063】

該膜蛋白質を含有する細胞やその膜画分中の膜蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのがより好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明の膜蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の①~③の方法を実施するためには、適当な膜蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。

膜蛋白質画分としては、天然型の膜蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型膜蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等の

リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^3\text{S}]$ などで標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテログastrin、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンなどが好適である。

【0064】

具体的には、本発明の膜蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を行なうには、まず本発明の膜蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することにより膜蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH 4～10（望ましくはpH 6～8）のリン酸バッファー、トリス塩酸バッファーなどのリガンドと膜レセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～50000

0 c p m) の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約 $0\sim 50^\circ\text{C}$ 、望ましくは約 $4\sim 37^\circ\text{C}$ で、約 20 分～24 時間、望ましくは約 30 分～3 時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいは γ -カウンターで計測する。全結合量 (B) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント ($B - \text{NSB}$) が 0 c p m を越える試験化合物を本発明の膜蛋白質またはその塩に対するリガンド (アゴニスト) として選択することができる。

【0065】

本発明の膜蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の④～⑤の方法を実施するためには、該膜蛋白質を介する細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など) を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、膜蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質 (例えば、アラキドン酸など) の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP 産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

【0066】

本発明の蛋白質に対して特異的親和性を有する化合物の決定方法について、膜蛋白質の場合を詳細に取り上げて説明したが、当業者は、上記の手法を応用して、本発明の蛋白質が分泌蛋白質の場合についても容易に特異的親和性を有する化

合物の決定を実施することができるだろう。

【0067】

本発明の蛋白質またはその塩に対して特異的親和性を有する化合物の決定用キットは、本発明の蛋白質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明の蛋白質を含有する細胞、本発明の蛋白質を含有する細胞の膜画分、本発明の蛋白質を分泌する細胞の培養上清などを含有するものである。

本発明のリガンド（レセプター）決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. リガンド（レセプター）決定用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②膜（分泌）蛋白質標品

本発明の膜（分泌）蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5×10⁵個／穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの（分泌蛋白質の場合、該プレートは該蛋白質に対する抗体でコーティングされている）。

③標識試験化合物

市販の〔3H〕、〔125I〕、〔14C〕、〔35S〕などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの。

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μ Mに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを100～1000倍濃い濃度に調製する。

【0068】

2. 測定法

- ① 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明の膜蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後（分泌蛋白質発現CHO細胞の場合は、細胞および培養上清を除去後プレートを測定用緩衝液で同様に洗浄した後）、490 μ lの測定用緩衝液を各穴に加える。
- ② 標識試験化合物を5 μ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5 μ l加えておく。
- ③ 反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞（プレート）に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。
- ④ 液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定する。

【0069】

本発明の膜蛋白質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳、下垂体、膵臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテステイナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテログاستリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニンなどが用いられる。また、本発明の分泌蛋白質またはその塩に結合することができるレセプターとしては、上記したリガンドに対するレセプターや種々

のオーファンレセプターなどが用いられる。

【0070】

(2) 本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤

上記(1)の方法において、本発明の蛋白質に対して特異的親和性を有する化合物が明らかになれば、該化合物が有する作用に応じて、①本発明の蛋白質等または②該蛋白質等をコードするDNAを、本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明の蛋白質が減少しているためにリガンド（またはレセプター）の生理作用が期待できない（該蛋白質の欠乏症）患者がいる場合に、①本発明の蛋白質を該患者に投与し該蛋白質の量を補充したり、②（イ）本発明の蛋白質等をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）対象となる細胞に本発明の蛋白質等をコードするDNAを導入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内における本発明の蛋白質等の量を増加させ、リガンド（またはレセプター）の作用を十分に発揮させることができる。即ち、本発明の蛋白質等およびそれらをコードするDNAは、安全で低毒性な、本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として有用である。

本発明の蛋白質は、高脂肪食負荷ストレス時に白色脂肪細胞で高発現することから、脂肪細胞の分化および／または代謝機能の異常（不全もしくは亢進）が関与する疾患（例えば、肥満症、糖尿病、耐糖能異常、動脈硬化、高血圧、高脂血症など）の予防および／または治療に有用である。

本発明の蛋白質等を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明の蛋白質等をコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどの適当な発現ベクター中に挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによっ

て投与できる。

例えば、①本発明の蛋白質等または②該蛋白質等をコードするDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明の蛋白質等または②該蛋白質等をコードするDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0071】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0072】

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明の蛋白質等の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、糖尿病患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、糖尿病患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

【0073】

(3) 本発明の蛋白質の過剰発現に関連する疾患の予防および／または治療剤
本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発

明の蛋白質の関与するシグナル伝達機能、例えば、該蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を不活性化（すなわち中和）することができる。一方、本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドのアンチセンスヌクレオチド（リボザイムやRNAi活性を有する二本鎖オリゴRNAを含む）は、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写、転写産物のプロセッシングおよび／またはmRNAからの翻訳をブロックすることにより、該蛋白質の発現を阻害することができる。従って、①本発明の蛋白質等に対する抗体または②該蛋白質等のアンチセンスヌクレオチドを、本発明の蛋白質の過剰発現に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医薬として使用することができる。

本発明の蛋白質は高脂肪食負荷ストレス時に白色脂肪細胞で高発現することから、本発明の蛋白質等に対する抗体または該蛋白質等のアンチセンスヌクレオチドは、脂肪細胞の分化および／または代謝機能の異常（不全もしくは亢進）が関与する疾患（例えば、肥満症、糖尿病、耐糖能異常、動脈硬化、高血圧、高脂血症など）の予防および／または治療に有用である。

本発明の蛋白質等に対する抗体を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。例えば、本発明の蛋白質等を含有する医薬について上述したのと同様の方法により製剤化することができる。

本発明の蛋白質等のアンチセンスヌクレオチドを上記予防・治療剤として使用する場合は、該アンチセンスヌクレオチドを単独で、あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどの適当な発現ベクター中に挿入した後、常套手段に従って製剤化することができる。該アンチセンスヌクレオチドは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明の蛋白質等に対する抗体の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、糖尿病患者（

60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病患者(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

本発明のアンチセンスヌクレオチドの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、糖尿病患者(60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病患者(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0074】

(4) 遺伝子診断剤

本発明のDNAまたはアンチセンスDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)における本発明の蛋白質をコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAまたはアンチセンスDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(ゲノミックス(Genomics), 第5巻, 874~879頁(1989年)、プロシージ

グズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ユー
エスエー (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United
States of America), 第86巻, 2766~2770頁(1989年))など
により実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより本発明の蛋白質の発現低下が
検出された場合は、例えば、該蛋白質の機能不全に関連する疾患に罹患している
、もしくは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また逆に、例え
ば、ノーザンハイブリダイゼーションにより本発明の蛋白質の発現過多が検出さ
れた場合は、例えば、該蛋白質の機能亢進に関連する疾患に罹患している、もし
くは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

本発明の蛋白質は、高脂肪食負荷ストレス時に白色脂肪細胞で高発現すること
から、本発明のDNAまたはアンチセンスDNAは、脂肪細胞の分化および／ま
たは代謝機能の異常(不全もしくは亢進)が関与する疾患(例えば、肥満症、糖
尿病、耐糖能異常、動脈硬化、高血圧、高脂血症など)の診断に有用である。

【0075】

(5) 本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のス
クリーニング方法

本発明のDNAは、プローブとして用いることにより、本発明の蛋白質または
その部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることが
できる。

すなわち本発明は、例えば、(i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、
③臓器から単離した組織もしくは細胞、または(ii) 形質転換体等に含まれる本
発明の蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を測定することによる、本発
明の蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニ
ング方法を提供する。

【0076】

本発明の蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量の測定は具体的には以下
のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサ

ギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には、肥満マウス、糖尿病マウス、高血圧ラット、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗肥満薬、抗糖尿病薬、降圧薬、血管作用薬、抗癌剤など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織（脂肪組織など）、あるいは細胞（白色もしくは褐色脂肪細胞など）を得る。

得られた細胞に含まれる本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの mRNA は、例えば、通常の方法により細胞等から mRNA を抽出し、例えば TaqManPCR などの手法を用いることにより定量することができ、自体公知の手段によりノーザンブロットを行なうことにより解析することもできる。

(ii) 本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を前述の方法に従い作製し、該形質転換体に含まれる本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの mRNA を同様にして定量、解析することができる。

【0077】

本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前ないし24時間前、好ましくは30分前ないし12時間前、より好ましくは1時間前ないし6時間前）もしくは一定時間後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、細胞に含まれる本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの mRNA 量を定量、解析することにより行なうことができ、

(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後ないし7日後、好ましくは1日後ないし3日後、より好ましくは2日後ないし3日後）、該形質転換体に含まれる本発明の蛋白質またはそ

の部分ペプチドの mRNA 量を定量、解析することにより行なうことができる。

【0078】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) 本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を増加させることにより、リガンド-レセプター相互作用を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を増強させる化合物、(ロ) 本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明の蛋白質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明の蛋白質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

【0079】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明の蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、糖尿病患者（60 kg

として)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病患者(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0080】

(6) 本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を含む有する各種疾病の予防および/または治療剤

本発明の蛋白質は前述のとおり、高脂肪食負荷ストレス時に白色脂肪細胞で高発現することから、脂肪細胞の分化および/または代謝機能の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。従って、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物は、脂肪細胞の分化および/または代謝機能の異常(不全もしくは亢進)が関与する疾患(例えば、肥満症、糖尿病、耐糖能異常、動脈硬化、高血圧、高脂血症など)の予防および/または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明の蛋白質の機能不全もしくは亢進に関連する疾患の予防および/または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0081】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0082】

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、糖尿病患者（60 kg として）においては、一日につき約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~

50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病患者（60 kg として）においては、一日につき約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

【0083】

(7) 本発明の蛋白質に対するリガンド（レセプター）の定量法

本発明の蛋白質等は、リガンド（またはレセプター）に対して結合性を有しているため、生体内におけるリガンド（またはレセプター）濃度を感度良く定量することができる。

本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明の蛋白質等と接触させることによって被検体中のリガンド（レセプター）濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和 49 年発行）

②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和 54 年発行）

【0084】

(8) 本発明の蛋白質とリガンド（レセプター）との結合性を变化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法

本発明の蛋白質等を用いるか、または組換え型蛋白質等の発現系を構築し、該発現系を用いたアフィニティーアッセイ系を用いることによって、本発明の蛋白質等とリガンド（またはレセプター）の結合性を变化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

このような化合物には、（イ）レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋

白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性などを有する化合物（いわゆる、本発明の膜蛋白質もしくは本発明の分泌蛋白質のレセプターに対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明の膜蛋白質もしくは本発明の分泌蛋白質のレセプターに対するアンタゴニスト）、（ハ）本発明の蛋白質とリガンド（またはレセプター）との結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）本発明の蛋白質とリガンド（またはレセプター）との結合力を減少させる化合物などが含まれる（なお、上記（イ）の化合物は、上記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい）。

すなわち、本発明は、（i）本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンド（またはレセプター）とを接触させた場合と（ii）本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンド（またはレセプター）および試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンド（またはレセプター）と本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、（i）と（ii）の場合における、例えば、該蛋白質等に対するリガンド（またはレセプター）の結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

【0085】

より具体的には、本発明は、

- ①標識したリガンド（またはレセプター）を、本発明の蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンド（またはレセプター）および試験化合物を本発明の蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンド（またはレセプター）の該蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンド（またはレセプター）と本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- ②標識したリガンド（またはレセプター）を、本発明の蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分、あるいは細胞外液または細胞培養上清（この場合、例え

ば、上記の本発明の抗体を固定化した固相（細胞培養プレート等）を用いて分泌蛋白質を固相化する）に接触させた場合と、標識したリガンド（またはレセプター）および試験化合物を本発明の蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分、あるいは細胞外液または細胞培養上清に接触させた場合における、標識したリガンド（またはレセプター）の該細胞または該膜画分、あるいは細胞外液または細胞培養上清に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンド（またはレセプター）と本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識したリガンド（またはレセプター）を、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質等、または培養上清に分泌された蛋白質等（この場合、例えば、上記の本発明の抗体を固定化した固相（細胞培養プレート等）を用いて分泌蛋白質を固相化する）に接触させた場合と、標識したリガンド（またはレセプター）および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質等、または培養上清に分泌された蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンド（またはレセプター）の該蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンド（またはレセプター）と本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0086】

④本発明の蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明の膜蛋白質等に対するリガンドなど）または本発明の蛋白質等により活性化される化合物（例えば、本発明の分泌蛋白質に対するレセプターなど）を、本発明の蛋白質等を細胞膜上に含有する細胞または本発明の蛋白質等が分泌された培養上清に接触させた場合と、本発明の蛋白質等を活性化する化合物または本発明の蛋白質等により活性化される化合物および試験化合物を、本発明の蛋白質等を細胞膜上に含有する細胞または本発明の蛋白質等が分泌された培養上清に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、

pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、比較することとを特徴とするリガンド(またはレセプター)と本発明の蛋白質等との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤本発明の蛋白質等を活性化する化合物(例えば、本発明の膜蛋白質等に対するリガンドなど)または本発明の蛋白質等により活性化される化合物(例えば、本発明の分泌蛋白質に対するレセプターなど)を、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質等または本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって培養上清中に分泌された本発明の蛋白質等に接触させた場合と、本発明の蛋白質等を活性化する化合物または本発明の蛋白質等により活性化される化合物および試験化合物を、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質等または本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって培養上清中に分泌された本発明の蛋白質等に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、比較することとを特徴とするリガンド(またはレセプター)と本発明の蛋白質等との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0087】

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明の蛋白質等としては、上記した本発明の蛋白質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明の蛋白質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分または細胞外液が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来の蛋白質等などが適している。

【0088】

本発明の蛋白質等を製造するには、前述の方法が用いられるが、本発明のDN

Aを哺乳細胞や昆虫細胞で発現させることにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明の蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現した蛋白質の量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明の蛋白質等を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製した蛋白質等であってもよいし、該膜蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分、あるいは該分泌蛋白質を含有する細胞培養上清を用いてもよい。

【0089】

本発明のスクリーニング方法において、本発明の膜蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明の膜蛋白質を含有する細胞としては、本発明の膜蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細

胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した膜蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

【0090】

該膜蛋白質を含有する細胞やその膜画分中の膜蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのがより好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0091】

リガンドと本発明の膜蛋白質等との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記の①～③を実施するためには、例えば、適当な膜蛋白質画分と、標識したリガンドが必要である。

膜蛋白質画分としては、天然型の膜蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型膜蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたりガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンドと本発明の膜蛋白質等との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明の膜蛋白質等を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより膜蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス塩酸バッファーなどのリガンドと膜蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王アトラス社）、ジギト

ニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的で PMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01~10ml の該レセプター溶液に、一定量（5000cpm~500000cpm）の標識したリガンドを添加し、同時に 10^{-4} M~ 10^{-10} M の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約 0℃ から 50℃、望ましくは約 4℃ から 37℃ で、約 20 分から 24 時間、望ましくは約 30 分から 3 時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたは γ -カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ B_0 ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0 - \text{NSB}$ ）を 100% とした時、特異的結合量（ $B - \text{NSB}$ ）が、例えば、50% 以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0092】

リガンドと本発明の膜蛋白質等との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記の④~⑤の方法を実施するためには、例えば、膜蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明の膜蛋白質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困

難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。
また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な膜蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明の膜蛋白質等を発現した細胞としては、天然型の本発明の膜蛋白質等を有する細胞株、前述の組換え型膜蛋白質等を発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0093】

リガンド（またはレセプター）と本発明の蛋白質とそれに対して特異的親和性を有する化合物の結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法について、リガンドと膜蛋白質との結合性を变化させる化合物の場合を詳細に取り上げて説明したが、当業者は、上記の手法を応用して、本発明の分泌蛋白質とレセプターの結合性を变化させる化合物についても容易にスクリーニングすることができる。

【0094】

本発明の蛋白質等とそれに対して特異的親和性を有する化合物（リガンド、レセプター）の結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の蛋白質等、本発明の蛋白質等を含有する細胞、本発明の蛋白質等を含有する細胞の膜画分、あるいは本発明の蛋白質等を分泌する細胞の培養上清などを含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アル

ブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径 $0.45\ \mu\text{m}$ のフィルターで濾過滅菌し、 4°C で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②膜（分泌）蛋白質標品

本発明の膜（分泌）蛋白質を発現させた CHO 細胞を、12 穴プレートに 5×10^5 個／穴で継代し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、 $95\%\text{air}$ で 2 日間培養したもの（分泌蛋白質の場合、該プレートは該蛋白質に対する抗体でコーティングされている）。

③標識リガンド（レセプター）

市販の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ など標識したリガンド（レセプター）

水溶液の状態のものを 4°C あるいは -20°C にて保存し、用時に測定用緩衝液にて $1\ \mu\text{M}$ に希釈する。

④リガンド（レセプター）標準液

リガンド（レセプター）を 0.1% ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含む PBS で 1mM となるように溶解し、 -20°C で保存する。

標識レセプターおよびレセプター標準液としては、レセプター蛋白質を適当な脂質組成からなるリポソーム膜に包埋させたプロテオリポソームを適当な分散媒（水、PBS 等）中に懸濁し、 4°C で保存したものを用いることもできる。

【0095】

2. 測定法

① 12 穴組織培養用プレートにて培養した本発明の膜蛋白質発現 CHO 細胞を、測定用緩衝液 1mL で 2 回洗浄した後（分泌蛋白質発現 CHO 細胞の場合は、細胞および培養上清を除去後プレートを測定用緩衝液で同様に洗浄した後）、 $490\ \mu\text{L}$ の測定用緩衝液を各穴に加える。

② $10^{-3} \sim 10^{-10}\text{M}$ の試験化合物溶液を $5\ \mu\text{L}$ 加えた後、標識リガンド（またはレセプター）を $5\ \mu\text{L}$ 加え、室温にて 1 時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3}M のリガンド（またはレセプター）標準液を $5\ \mu\text{L}$ 加えておく。

- ③反応液を除去し、1 ml の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞（またはプレート）に結合した標識リガンド（またはレセプター）を0.2 N NaOH-1 % SDSで溶解し、4 ml の液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。
- ④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

【0096】

〔数1〕

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀ : 最大結合量

【0097】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、本発明の蛋白質等とそれに対して特異的親和性を有する化合物（リガンド、レセプター）との結合性を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）リガンド-レセプター相互作用を介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明の膜蛋白質または本発明の分泌蛋白質のレセプターに対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明の膜蛋白質または本発明の分泌蛋白質のレセプターに対するアンタゴニスト）、（ハ）本発明の蛋白質とリガンド（またはレセプター）との結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）本発明の蛋白質とリガンド（またはレセプター）との結合力を減少させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明の膜蛋白質等（もしくは本発明の分泌蛋白質等のレセプター）に対するアゴニストは、本発明の膜蛋白質等に対するリガンド（もしくはレセプターに対する本発明の分泌蛋白質等）が有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明の膜蛋白質等（もしくは本発明の分泌蛋白質等のレセプター）に対するアンタゴニストは、本発明の膜蛋白質等に対するリガンド（もしくはレセプターに対する本発明の分泌蛋白質等）が有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明の膜蛋白質とリガンド（もしくは本発明の分泌蛋白質とレセプター）との結合力を増強する化合物は、本発明の膜蛋白質等に対するリガンド（もしくはレセプターに対する本発明の分泌蛋白質）が有する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明の膜蛋白質とリガンド（もしくは本発明の分泌蛋白質とレセプター）との結合力を減少させる化合物は、本発明の膜蛋白質等に対するリガンド（もしくはレセプターに対する本発明の分泌蛋白質）が有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

【0098】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明の蛋白質を含有する医薬と同様に、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、糖尿病患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合

は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0099】

(9) 本発明の膜蛋白質とリガンド（もしくは本発明の分泌蛋白質とレセプター）との結合性を变化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

本発明の蛋白質は前述のとおり、高脂肪食負荷ストレス時に白色脂肪細胞で高発現することから、脂肪細胞の分化および／または代謝機能の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。従って、上記の化合物は、脂肪細胞の分化および／または代謝機能の異常（不全もしくは亢進）が関与する疾患（例えば、肥満症、糖尿病、耐糖能異常、動脈硬化、高血圧、高脂血症など）の予防および／または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明の蛋白質の機能不全もしくは亢進に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0100】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロ

ースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0101】

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、糖尿病患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なる。

るが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0102】

(10) 本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量

本発明の抗体は、本発明の蛋白質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明の蛋白質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化蛋白質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化蛋白質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明の蛋白質等の定量法、

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明の蛋白質等の定量法を提供する。

上記(ii)においては、不溶化抗体と標識化抗体とが互いに本発明の蛋白質等との結合を妨害しないような抗原認識部位を有することが好ましい（例えば、一方の抗体が本発明の蛋白質等のN端部を認識し、他方の抗体が該蛋白質等のC端部に反応する等）。

【0103】

本発明の蛋白質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明の蛋白質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分を用いてもよい。本発明の蛋白質等に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、本発明の蛋白質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線よ

り算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0104】

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明の蛋白質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は上記のそれらに準じることができる。

また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による蛋白質等の測定法においては、1次反応と2次

反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は蛋白質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明の蛋白質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

【0105】

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、上記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0106】

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常技術的配慮を加えて本発明の蛋白質またはその塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成

書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンジモロジー (Methods in ENZYMOLOGY)」 Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照〕。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明の蛋白質またはその塩を感度良く定量することができる。

さらに、本発明の抗体を用いて、生体内での本発明の蛋白質またはその塩を定量することによって、本発明の蛋白質の機能不全もしくは亢進に関連する各種疾患の診断をすることができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明の蛋白質等を特異的に検出するために使用することができる。また、本発明の蛋白質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明の蛋白質等の検出、被検細胞内における本発明の蛋白質の挙動の分析などのために使用することができる。

【0107】

(11) 細胞膜または細胞外における本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明の抗体は、本発明の蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を特異的に認識することができるので、細胞膜または細胞外における本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニングに用いること

ができる。

すなわち本発明は、例えば、

(i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法（非ヒト哺乳動物の血漿、尿、その他の体液等の細胞外液を分離し、それに含まれる本発明の分泌蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞外における本発明の分泌蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法）、

(ii) 本発明の膜蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法（本発明の分泌蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体の培養上清を分離し、該培養上清に含まれる本発明の分泌蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞外における本発明の分泌蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法）、

(iii) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での本発明の膜蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該膜蛋白質を確認することによる、細胞膜における本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(iv) 本発明の膜蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該膜蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該膜蛋白質を確認することによる、細胞膜における本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

【0108】

細胞膜画分に含まれる本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチドの定量は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には、肥満マウス、糖尿病マウス、高血圧ラット、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗肥満薬、抗糖尿病薬、降圧剤、血管作用薬、抗癌剤など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織（脂肪組織など）、あるいは細胞（白色もしくは褐色脂肪細胞など）を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘペス緩衝液など）等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面活性剤（例えば、トリトンX100TM、ツイーン20TMなど）などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手法を用いて細胞膜画分を得る。

【0109】

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した膜蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

【0110】

細胞膜画分に含まれる本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチドは、例えば、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウエスタンブロット解析などに

より定量することができる。

かかるサンドイッチ免疫測定法は前述の方法と同様に行なうことができ、ウエスタンブロットは自体公知の手段により行なうことができる。

【0111】

(ii) 本発明の膜蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を前述の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれる本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチドを定量することができる。

【0112】

細胞膜における本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前ないし24時間前、好ましくは30分前ないし12時間前、より好ましくは1時間前ないし6時間前）もしくは一定時間後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、細胞膜における本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行なうことができ、

(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後ないし7日後、好ましくは1日後ないし3日後、より好ましくは2日後ないし3日後）、細胞膜における本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行なうことができる。

【0113】

細胞膜画分に含まれる本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチドの確認は具体的には以下のようにして行なう。

(iii) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には、肥満マウス、糖尿病マウス、高血圧ラット、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して

、薬剤（例えば、抗肥満薬、抗糖尿病薬、降圧剤、血管作用薬、抗癌剤など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織（脂肪組織など）、あるいは細胞（白色もしくは褐色脂肪細胞など）を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、常法に従い組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。細胞表層での該膜蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該膜蛋白質を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜における本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチドの量を確認することができる。

(iv) 本発明の膜蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を用いて同様の手段をとることにより確認することもできる。

【0114】

本発明のスクリーニング方法について、細胞膜における本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチドも量を変化させる場合を詳細に取り上げて説明したが、当業者は、上記の手法を応用して、細胞外における本発明の分泌蛋白質またはその部分ペプチドも量を変化させる方法についても容易に実施することができる。

【0115】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞膜における本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチドの量、あるいは細胞外における本発明の分泌蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) 細胞膜における本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチド、あるいは細胞外における本発明の分泌蛋白質またはその部分ペプチドの量を増加させることにより、リガンドーレセプター相互作用を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を増強させる化合物、(ロ) 細胞膜における本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチド、あるいは細胞外における本発明の分泌蛋白質またはその部分ペプチドの量を減少させることにより、該細胞刺激活

性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明の蛋白質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明の蛋白質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

【0116】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する医薬と同様に、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、糖尿病患者（60 kg として）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病患者（60 kg として）においては、一日につき約0.01～30 mg 程度、好ましくは約0.1～20 mg 程度、より好ましくは約0.1～10 mg 程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

【0117】

(12) 細胞膜における本発明の膜蛋白質またはその部分ペプチドあるいは細胞外における本発明の分泌蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物

を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

本発明の蛋白質は前述のとおり、高脂肪食負荷ストレス時に白色脂肪細胞で高発現することから、脂肪細胞の分化および／または代謝機能の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。従って、上記の化合物は、脂肪細胞の分化および／または代謝機能の異常（不全もしくは亢進）が関与する疾患（例えば、肥満症、糖尿病、耐糖能異常、動脈硬化、高血圧、高脂血症など）の予防および／または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明の蛋白質の機能不全もしくは亢進に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0118】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の

補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0119】

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、糖尿病患者（60 kg として）においては、一日につき約 0.1~100 mg、好ましくは約 1.0~50 mg、より好ましくは約 1.0~20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病患者（60 kg として）においては、一日につき約 0.01~30 mg 程度、好ましくは約 0.1~20 mg 程度、より好ましくは約 0.1~10 mg 程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

【0120】

(13) 本発明の蛋白質をコードする DNA を有する非ヒト動物の作製

本発明は、外来性の本発明の蛋白質をコードする DNA（以下、本発明の外来性 DNA と略記する）またはその変異 DNA（本発明の外来性変異 DNA と略記

する場合がある)を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- 〔1〕 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- 〔2〕 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第〔1〕記載の動物、
- 〔3〕 ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第〔2〕記載の動物、および
- 〔4〕 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リボフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作成することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F1系統、BDF1系統、B6D2F1系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

【0121】

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNA

ではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠失、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明の蛋白質等を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明の蛋白質の機能を抑制する蛋白質等を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

【0122】

本発明のDNAを担持させる発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 λ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニーマウス白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリ

ンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性蛋白質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1, K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存蛋白質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ペプチド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎蛋白質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

【0123】

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明の蛋白質等の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウ

サギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど) 由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常な本発明の蛋白質等の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異させた翻訳領域を作製することによって得ることができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流(および所望により転写終結部位の上流)に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

【0124】

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を増強することにより最終的に本発明の蛋白質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能亢進症や、該蛋白質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明の蛋白質の増加症状を有することから、該蛋白質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

【0125】

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明の蛋白質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検

討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症における本発明の異常蛋白質による正常蛋白質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明の異常蛋白質の増加症状を有することから、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
- ②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現された蛋白質を分析することによる、本発明の蛋白質により特異的に発現あるいは活性化する蛋白質等との関連性についての解析、
- ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用しての、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- ④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
- ⑤本発明の変異蛋白質の単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症などを含む、該蛋白質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明の蛋白質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどの蛋白質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明の蛋白質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明の蛋白質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症を含む、該蛋白質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外來性DNA発現ベクターを用いて、本発明の蛋白質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

【0126】

(14) 本発明の蛋白質が不活性化されたノックアウト非ヒト動物の作製

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- 〔1〕 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- 〔2〕 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第〔1〕項記載の胚幹細胞、
- 〔3〕 ネオマイシン耐性である第〔1〕項記載の胚幹細胞、
- 〔4〕 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第〔1〕項記載の胚幹細胞、
- 〔5〕 ゲッ歯動物がマウスである第〔4〕項記載の胚幹細胞、
- 〔6〕 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- 〔7〕 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第〔6〕項記載の非ヒト哺乳動物、
- 〔8〕 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第〔6〕項記載の非ヒト哺乳動物、
- 〔9〕 ゲッ歯動物がマウスである第〔8〕項記載の非ヒト哺乳動物、および
- 〔10〕 第〔7〕項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現

能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明の蛋白質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明の蛋白質の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

【0127】

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、poly A付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞とし

ては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知のEvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス(C57BL/6とDBA/2とのF₁)を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

【0128】

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁶個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細

胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n = 40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1-1000 U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001-0.5%トリプシン/0.1-5 mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1 mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin, プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー (J. Embryol. Exp. Morphol.)、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明の蛋白質または該蛋白質の細胞生物学的検討において有用である。

【0129】

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入されたターゲッティングベクター中の本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。哺乳動物における組換えの多くは非相同的であるため、相同組換えを起こした細胞をスクリーニングする手段として、例えば、本発明のDNAの内部にネオマイシン耐性遺伝子などの薬剤耐性遺伝子を挿入するとともに、本発明のDNAの近傍にチミジンキナーゼ（tk）遺伝子を含むターゲッティングベクターを構築して胚幹細胞または卵細胞に導入し、挿入された薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子であればG418等）およびガンシクロビル存在下で生存する細胞を選択する方法が挙げられる。即ち、相同組換えにより本発明の挿入変異DNAが染色体上に組み込まれた場合、tk遺伝子は排除されるのでガンシクロビル耐性であるが、非相同組換えで組み込まれた場合はtk遺伝子も同時に組み込まれるためガンシクロビル感受性となる。また、tk遺伝子の代わりにジフテリア毒素遺伝子などを用いれば、ランダム挿入された細胞は該毒素の産生により死滅するので、単一の薬剤での選択が可能となる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞の最終的な確認は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析を用いて行なうことができる。

非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常ヘテロ発現不全個体であるので、当該ヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明の蛋白質のホモ発現不全個体を得ることができる。

【0130】

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物から、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明の蛋白質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、該蛋白質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

【0131】

(14a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

【0132】

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の血糖値が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上低下した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選

ばれた化合物であり、本発明の蛋白質の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患、例えば、脂肪細胞の分化および／または代謝機能の異常が関与する疾患（例：肥満症、糖尿病、耐糖能異常、動脈硬化、高血圧、高脂血症など）に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明の蛋白質とリガンド（またはレセプター）との結合性を変化させる化合物を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に例えば、糖尿病患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与すること

ができる。

【0133】

(14b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明の蛋白質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、本発明の蛋白質の発現する組織で、該蛋白質の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド (X-gal) のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明の蛋白質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明の蛋白質を欠損するマウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗

浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

【0134】

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明の蛋白質の発現を促進し、該蛋白質の機能を促進することができるので、例えば、本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患などの予防・治療薬などの医薬として有用である。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明の蛋白質の発現を阻害し、該蛋白質の機能を阻害することができるので、例えば、該蛋白質の発現過多に関連する疾患などの予防・治療薬などの医薬として有用である。

本発明の蛋白質の機能不全もしくは発現過多に関連する疾患としては、例えば、脂肪細胞の分化および／または代謝機能の異常が関与する疾患（例えば、肥満症、糖尿病、耐糖能異常、動脈硬化、高血圧、高脂血症など）等が挙げられる。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

【0135】

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明の蛋白質とリガンド（またはレセプター）との結合性を変化させる化合物を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に例えば、糖尿病患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明の蛋白質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々の蛋白質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にその蛋白質を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明の蛋白質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

【0136】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、I

UPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム

【0137】

Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン

G l u	: グルタミン酸
A s p	: アスパラギン酸
L y s	: リジン
A r g	: アルギニン
H i s	: ヒスチジン
P h e	: フェニルアラニン
T y r	: チロシン
T r p	: トリプトファン
P r o	: プロリン
A s n	: アスパラギン
G l n	: グルタミン
p G l u	: ピログルタミン酸
M e	: メチル基
E t	: エチル基
B u	: ブチル基
P h	: フェニル基
T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

【0138】

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

T o s	: p -トルエンスルフォニル
C H O	: ホルミル
B z l	: ベンジル
C l ₂ B z l	: 2, 6 -ジクロロベンジル
B o m	: ベンジルオキシメチル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
C l - Z	: 2 -クロロベンジルオキシカルボニル
B r - Z	: 2 -ブロモベンジルオキシカルボニル
B o c	: t -ブトキシカルボニル

DNP	: ジニトロフェノール
Trt	: トリチル
Bum	: t-ブトキシメチル
Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
HOBt	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
HOObt	: 3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシー-4-オキソ- 1,2,3-ベンゾトリアジン
HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

【0139】

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst20-6の塩基配列を示す。

〔配列番号：2〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst20-6にコードされるアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：3〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst22-22の塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst22-22にコードされるアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：5〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst9-8の塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst9-8にコードされる推定アミノ酸配列の1つを示す。

〔配列番号：7〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst9-8にコードされる推定アミノ酸配列の1つを示す。

〔配列番号：8〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst9-8にコードされる推定アミノ酸配列の1つを示す。

〔配列番号：9〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst13-11の塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst13-11にコードされる推定アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：11〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst19-15の塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst19-15にコードされる推定アミノ酸配列の1つを示す。

〔配列番号：13〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst19-15にコードされる推定アミノ酸配列の1つを示す。

〔配列番号：14〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst19-20の塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst19-20にコードされる推定アミノ酸配列の1つを示す。

〔配列番号：16〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst19-20にコードさ

れる推定アミノ酸配列の1つを示す。

〔配列番号: 17〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst20-14の塩基配列を示す。

〔配列番号: 18〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst20-14にコードされる推定アミノ酸配列の1つを示す。

〔配列番号: 19〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst20-14にコードされる推定アミノ酸配列の1つを示す。

〔配列番号: 20〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst21-3の塩基配列を示す。

〔配列番号: 21〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst21-3にコードされる推定アミノ酸配列の1つを示す。

〔配列番号: 22〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst21-3にコードされる推定アミノ酸配列の1つを示す。

〔配列番号: 23〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst8-5の塩基配列を示す。

〔配列番号: 24〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst8-5にコードされる推定アミノ酸配列の1つを示す。

〔配列番号: 25〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA mSst8-5にコードされる推定アミノ酸配列の1つを示す。

〔配列番号: 26〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA断片を増幅するためのプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号: 27〕

マウス白色脂肪細胞由来分泌もしくは膜蛋白質 cDNA断片を増幅するためのプライマーの塩基配列を示す。

【0140】

【実施例】

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning; 上述) に記載されている方法に従った。

【0141】

実施例1 マウス白色脂肪組織由来の分泌・膜蛋白質 cDNAのスクリーニング

マウスプロB細胞株Ba/F3 (理研セルバンク; RCB0805) は、その生存・増殖にIL-3が必須である。該細胞は細胞膜上にトロンボポイエチン受容体 (MPL) を発現しており、リガンドであるトロンボポイエチンの結合によりホモ二量体を形成し、細胞内に増殖シグナルが伝えられる。MPLは、膜貫通領域のSer498Asn変異によりリガンド非依存的な恒常的活性型 (MPLM) になり、Ba/F3がIL-3非存在下においてもその生存・増殖が維持され、しかも、MPLMの活性には細胞外ドメインの大半は不要で、C末端の187アミノ酸を含めば細胞膜上に発現してホモ二量体を形成し得ることが見出されている (KojimaおよびKitamura, 上述)。すなわち、細胞外領域を欠失させたMPLMの5'側にcDNAを組み込めるようデザインされたレトロウイルスベクターを作製し、組み込んだcDNAがシグナルシーケンスを有していれば、cDNAにコードされた蛋白質とMPLMの融合蛋白質がBa/F3の細胞膜上に発現し、該Ba/F3がIL-3非依存下で生存・増殖することになる。この原理に基づいて、Met1~Thr441を欠失させたMPLMのコード領域 (Δ MPLM) を含むレトロウイルスベクター (pMX-SST; KojimaおよびKitamura, 上述) のBstXIサイトに、高脂肪食負荷マウス白色脂肪組織由来cDNAを挿入してレ

トロウイルス発現ライブラリーを構築し、分泌・膜蛋白質 cDNA のクローニングを行った。

まず、高脂肪食負荷マウス (C57Bl/6J, 12週齢, オスに12日間30%高脂肪食を与えた) から内臓脂肪組織(腸間膜および副睾丸周囲の白色脂肪)を切除し、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia) を用いて、添付のプロトコールに従って poly A(+) RNA を単離し、SuperScript Choice System (Gibco-BRL) を用いてランダムヘキサマーにより cDNA に変換した。得られた cDNA を、BstXI アダプター (Invitrogen) を用いてレトロウイルスベクター pMX-SST の BstXI サイトに挿入し、MPL^M の 5' 側に該 cDNA をライゲーションさせた。得られた DNA を E. coli DH10B 株にエレクトロポレーション法を用いて導入し、増幅させた。常法に従ってプラスミド DNA を精製し、レトロウイルス作製用パッケージング細胞 (Plat-E; Morita ら, Gene Ther., 7(12): 1063-1066, 2000; 東京大学・医科学研究所・北村俊雄博士より入手可能) (2×10^6 細胞/dish) に LipofectamineTM 試薬 (Invitrogen) を用いて添付のプロトコールに従いトランスフェクションした。10%ウシ胎仔血清添加 DMEM 培地中で 24 時間培養後に、同新鮮培地に交換し 24 時間培養し培養上清を採取して感染性を有した高力価レトロウイルスストック (感染効率 10-30%) を得た。このレトロウイルスストックで蛋白質発現用細胞 (Ba/F3) を感染させ、IL-3 添加 RPMI1640 培地中で 1 日間培養した後、96-well プレート中に 1×10^4 /well となるように播き、IL-3 無添加培地中で選択した。感染後に増殖性を保持した Ba/F3 を選択し、それらから常法によりゲノム DNA を抽出した。次いで、配列番号 26 および 27 に示されるオリゴヌクレオチドをプライマーとし、ゲノム DNA を鋳型として PCR を行った (98℃、60秒の後、98℃、20秒および 68℃、120秒を 30 サイクル)。増幅された断片を pENTR/D-topo (Invitrogen, 登録商標) にサブクローニングした。各 cDNA インサートの塩基配列を BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Kit (PE Biosystems) および DNA 自動シーケンサー (ABI Prism 377) を用いて決定したところ、9つの新規な cDNA クローン (Sst20-6、Sst22-22、Sst9-8、Sst13-11、Sst19-15、Sst19-20、Sst20-14、Sst21-3 および Sst8-5) が確認された。

尚、上記 9 種の cDNA クローンをそれぞれ挿入されたプラスミド pENTR/D-TOPO (

20-6)、pENTR/D-TOPO (22-22)、pENTR/D-TOPO (9-8)、pENTR/D-TOPO (13-11)、pENTR/D-TOPO (19-15)、pENTR/D-TOPO (19-20)、pENTR/D-TOPO (20-14)、pENTR/D-TOPO (21-3)およびpENTR/D-TOPO (8-5)で大腸菌コンピテントセル*Escherichia coli* Top10 (Invitrogen) を形質転換し、形質転換体*Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (20-6)、*Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (22-22)、*Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (9-8)、*Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (13-11)、*Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (19-15)、*Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (19-20)、*Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (20-14)、*Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (21-3)および*Escherichia coli* Top10/pENTR/D-TOPO (8-5)株を得た。これらの大腸菌株は、それぞれFERM BP-8106、FERM BP-8109、FERM BP-8105、FERM BP-8107、FERM BP-8108、FERM BP-8103、FERM BP-8104、FERM BP-8102およびFERM BP-8110の受託番号を付され、平成14年7月2日付で独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6)に寄託されている。

【 0 1 4 2 】

実施例 2 新規分泌・膜蛋白質遺伝子の発現解析

実施例 1 で得られた新規cDNAをプローブとして用い、種々の条件下でノーザンブロット解析によりこれらの遺伝子の発現の様子を調べた。

まず、白色脂肪組織における発現と、発現組織の特異性を解析した。その結果、Sst20-14は白色脂肪組織特異的な発現を示した。一方、Sst21-3, Sst13-11, Sst9-8, Sst19-15, Sst19-20は褐色脂肪組織においても発現が確認された。

Sst13-11は、高脂肪-高スクロース負荷マウスにおいて、対照マウスと比較して発現量が変動した。また、肥満モデルマウスob/obにおいても、対照のC57b16/Jマウスと比較して発現量が変動した。

Sst21-3は、糖尿病モデルマウスdb/dbにおいて、対照のC57b16/Jマウスと比較して発現量が変動した。また、白色脂肪に分化しうる3T3-L1細胞における発現を調べたところ、Sst21-3は未分化な前駆脂肪細胞でも発現していた。

Sst20-14は、得られたクローン断片中に、リポ蛋白質の脂質に結合しうるモチーフを有していた。

さらに、Sst20-14、Sst19-20、Sst19-15、Sst13-11、Sst21-3は、絶食あるいは絶食再給餌により発現量が変動した。

【 0 1 4 3 】

【発明の効果】

本発明の蛋白質は高脂肪食負荷により白色脂肪細胞で発現する分泌もしくは膜蛋白質であるので、脂肪細胞の分化や代謝機能の異常に関連する疾患の予防・治療剤として、あるいは当該疾患の予防・治療に有効な医薬品候補化合物のスクリーニングのためのツールとして有用である。

【 0 1 4 4 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Genes Encoding Secretory or Membrane Proteins Expressed in Adipocyte and Use Thereof

<130> B02233

<160> 27

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 812

<212> DNA

<213> Mus musculus.

<220>

<221> CDS

<222> (189)..(812)

<223>

<400> 1

ggaggctgag gcaagagggga gctgtccggg tggggagcca gcacttcctt cttcctcctc	60
tgcgtgaggg gagagaaggt tgggggtccc cgagcccatg gatcgggagg aggcggaggc	120
cgccgagagc cggcaccctt ctatgtggcc ctgagccccg tgtactgggt cgcctctct	180
ggaaggcc atg gag aag aga ctg gga gtc aag cca agt ccc gct tcc tgg	230
Met Glu Lys Arg Leu Gly Val Lys Pro Ser Pro Ala Ser Trp	
1 5 10	
gtt ttg cca gga tat tgt tgg cag aca tca gtg aag ctg ccg aga agc	278
Val Leu Pro Gly Tyr Cys Trp Gln Thr Ser Val Lys Leu Pro Arg Ser	
15 20 25 30	
ctg tac ctg ctt tac agt ttc ttc tgc ttc agc gtt ctg tgg ttg tca	326
Leu Tyr Leu Leu Tyr Ser Phe Phe Cys Phe Ser Val Leu Trp Leu Ser	
35 40 45	
aca gat gct gat gag agc aga tgc caa cag ggg aag aca ctt tat gga	374
Thr Asp Ala Asp Glu Ser Arg Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Tyr Gly	
50 55 60	
gct ggc ttg aga act gag gga gaa aat cac ctc cgg ctt ctt gca gga	422
Ala Gly Leu Arg Thr Glu Gly Glu Asn His Leu Arg Leu Leu Ala Gly	
65 70 75	
agc ctg cct ttc cac gcc tgt cgg gct gcc tgc tgc cgg gac tct gcc	470
Ser Leu Pro Phe His Ala Cys Arg Ala Ala Cys Cys Arg Asp Ser Ala	
80 85 90	
tgc cac gct cta tgg tgg ctg gaa ggg atg tgc ttt cag gct gac tgc	518
Cys His Ala Leu Trp Trp Leu Glu Gly Met Cys Phe Gln Ala Asp Cys	
95 100 105 110	

agt aag ccc cag agc tgc cag cct ttt agg aca gac tct tcc aat tcc 566
 Ser Lys Pro Gln Ser Cys Gln Pro Phe Arg Thr Asp Ser Ser Asn Ser
 115 120 125
 atg ctg atc att ttt caa aaa tcc caa act aca gat gat ttg ggc ctt 614
 Met Leu Ile Ile Phe Gln Lys Ser Gln Thr Thr Asp Asp Leu Gly Leu
 130 135 140
 ctg cct gaa gat gat gaa cca cat ctt ctg agg cta ggc tgg ggc agg 662
 Leu Pro Glu Asp Asp Glu Pro His Leu Leu Arg Leu Gly Trp Gly Arg
 145 150 155
 aca tcg tgg agg agg cag agc ctt ctt ggg gct ccc ctc acc ctt tct 710
 Thr Ser Trp Arg Arg Gln Ser Leu Leu Gly Ala Pro Leu Thr Leu Ser
 160 165 170
 gta ccc tct agt cac cac cag agc tta ctc agg gat cgg cag aag aga 758
 Val Pro Ser Ser His His Gln Ser Leu Leu Arg Asp Arg Gln Lys Arg
 175 180 185 190
 gat ctc agt gtg gta cct aca cat gga gcg atg cag cat tct aaa gtg 806
 Asp Leu Ser Val Val Pro Thr His Gly Ala Met Gln His Ser Lys Val
 195 200 205
 aat cac 812
 Asn His

<210> 2

<211> 208

<212> PRT

<213> Mus musculus.

<400> 2

Met Glu Lys Arg Leu Gly Val Lys Pro Ser Pro Ala Ser Trp Val Leu

出証特 2 0 0 3 - 3 0 6 5 5 1 3

<212> DNA

<213> Mus musculus.

<220>

<221> CDS

<222> (24)..(572)

<223>

<400> 3

gctgctgtca ggtgggccct ttt atg gtg ggt tcc tgt ggt cgc tgc gca gcg	53
Met Val Gly Ser Cys Gly Arg Cys Ala Ala	
1 5 10	
gct ggc cga ctt ccg cag cgg gtc tcg ggc cac cga gcg ccg tct tca	101
Ala Gly Arg Leu Pro Gln Arg Val Ser Gly His Arg Ala Pro Ser Ser	
15 20 25	
ccc agc gcc atg gct gtg gcc gct gtc ggc cgc ccg aga gcc ctg cgc	149
Pro Ser Ala Met Ala Val Ala Ala Val Gly Arg Pro Arg Ala Leu Arg	
30 35 40	
tgc ccg ctg ttg ctc ctg ctg tca ctc ctg ctg gta gcc ggc cct gcg	197
Cys Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Val Ala Gly Pro Ala	
45 50 55	
ctg ggc tgg aac gac cct gac aga ata ctc ttg cgg gat gtg aaa gct	245
Leu Gly Trp Asn Asp Pro Asp Arg Ile Leu Leu Arg Asp Val Lys Ala	
60 65 70	
ctt acc ctc tac tcc gac cgc tac acc acc tcc cgg agg ctg gac cct	293
Leu Thr Leu Tyr Ser Asp Arg Tyr Thr Thr Ser Arg Arg Leu Asp Pro	
75 80 85 90	
atc cca cag ttg aag tgt gtt gga ggc acc gcc ggt tgt gag gcc tat	341
Ile Pro Gln Leu Lys Cys Val Gly Gly Thr Ala Gly Cys Glu Ala Tyr	

95	100	105	
acc ccc agg gtg ata cag tgc cag aac aaa ggc tgg gat ggc tac gat			389
Thr Pro Arg Val Ile Gln Cys Gln Asn Lys Gly Trp Asp Gly Tyr Asp			
110	115	120	
gta cag tgg gaa tgt aag acc gac ttg gat att gca tac aaa ttt ggc			437
Val Gln Trp Glu Cys Lys Thr Asp Leu Asp Ile Ala Tyr Lys Phe Gly			
125	130	135	
aaa act gtg gtg agc tgt gaa ggc tac gag tcc tct gaa gac cag tat			485
Lys Thr Val Val Ser Cys Glu Gly Tyr Glu Ser Ser Glu Asp Gln Tyr			
140	145	150	
gtc ctc agg ggt tcc tgc ggc ttg gag tac aac tta gat tac aca gag			533
Val Leu Arg Gly Ser Cys Gly Leu Glu Tyr Asn Leu Asp Tyr Thr Glu			
155	160	165	170
ctg ggc ctg aag aaa ctg aag gag cgc ggc cgc gtc gac			572
Leu Gly Leu Lys Lys Leu Lys Glu Arg Gly Arg Val Asp			
175	180		

<210> 4

<211> 183

<212> PRT

<213> Mus musculus.

<400> 4

Met Val Gly Ser Cys Gly Arg Cys Ala Ala Ala Gly Arg Leu Pro Gln

1

5

10

15

Arg Val Ser Gly His Arg Ala Pro Ser Ser Pro Ser Ala Met Ala Val

20

25

30

Ala Ala Val Gly Arg Pro Arg Ala Leu Arg Cys Pro Leu Leu Leu Leu

35 40 45
 Leu Ser Leu Leu Leu Val Ala Gly Pro Ala Leu Gly Trp Asn Asp Pro
 50 55 60
 Asp Arg Ile Leu Leu Arg Asp Val Lys Ala Leu Thr Leu Tyr Ser Asp
 65 70 75 80
 Arg Tyr Thr Thr Ser Arg Arg Leu Asp Pro Ile Pro Gln Leu Lys Cys
 85 90 95
 Val Gly Gly Thr Ala Gly Cys Glu Ala Tyr Thr Pro Arg Val Ile Gln
 100 105 110
 Cys Gln Asn Lys Gly Trp Asp Gly Tyr Asp Val Gln Trp Glu Cys Lys
 115 120 125
 Thr Asp Leu Asp Ile Ala Tyr Lys Phe Gly Lys Thr Val Val Ser Cys
 130 135 140
 Glu Gly Tyr Glu Ser Ser Glu Asp Gln Tyr Val Leu Arg Gly Ser Cys
 145 150 155 160
 Gly Leu Glu Tyr Asn Leu Asp Tyr Thr Glu Leu Gly Leu Lys Lys Leu
 165 170 175
 Lys Glu Arg Gly Arg Val Asp
 180

<210> 5

<211> 703

<212> DNA

<213> Mus musculus.

<400> 5

gcgcgtcgcg gacccccgcc tgggcctcca gtgggacagc ctccctgggg gctttggcag 60
 gtgtcacttc ttcaccttgg cgatcataggt gcctgcgttt ttgtaggcac tcacgtagcc 120

actgtcgtcc aggatgtcct gccgtccagc gatgcccttt cccttgccgc tctcatcaaa 180
 gcgttctttg tgggagcccg tatacttact ggtgtccgtc agccgggtcca cagcaccacc 240
 cgtttttagct ttggtgacgc caatgttggc cggttccttg cccgctatca gctggcagat 300
 ggcacaaag gcctcctcct tggacttccc ctgaaccgc ttagttgcca gctcttccag 360
 ggccttcttg aactcctcat agttgattac tctagcagat ttgccttga ctttggagaa 420
 gacgatgtcg acgtcgggtgc ccgttacggc ctttccgtcg gccaccttac agtccttgca 480
 cagcttggcc cagttcttgc cattcatctc ttgcccgctg gccttgggggt cgccatggat 540
 ggcaaacttc cggaagctct cctccagccc agctatgtcc gtgctcgctg ccatgccacc 600
 cggcttctac cgcttggctg ctctgagcg tgccttcgga caggaccag gaactgatgc 660
 tggagaccag gaggtccac agctccgctc cctgccggct ccc 703

<210> 6

<211> 93

<212> PRT

<213> Mus musculus.

<400> 6

Met Ser Thr Ser Val Pro Val Thr Ala Phe Pro Ser Ala Thr Leu Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu His Ser Leu Ala Gln Phe Leu Pro Phe Ile Ser Cys Pro Leu
 20 25 30
 Ala Leu Gly Ser Pro Trp Met Ala Asn Phe Arg Lys Leu Ser Ser Ser
 35 40 45
 Pro Ala Met Ser Val Leu Ala Ala Met Pro Pro Gly Phe Tyr Arg Leu
 50 55 60
 Ala Ala Pro Glu Arg Ala Phe Gly Gln Asp Pro Gly Thr Asp Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Gln Glu Ala Pro Gln Leu Arg Ser Leu Pro Ala Pro

85

90

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus.

<400> 7

Met Leu Glu Thr Arg Arg Leu His Ser Ser Ala Pro Cys Arg Leu

1 5 10 15

<210> 8

<211> 82

<212> PRT

<213> Mus musculus.

<400> 8

Met Ser Cys Arg Pro Ala Met Pro Phe Pro Leu Pro Leu Ser Ser Lys

1 5 10 15

Arg Ser Leu Trp Glu Pro Val Tyr Leu Leu Val Ser Val Ser Arg Ser

20 25 30

Thr Ala Pro Pro Val Leu Ala Leu Val Thr Pro Met Leu Ala Gly Ser

35 40 45

Leu Pro Ala Ile Ser Trp Gln Met Ala Ser Lys Ala Ser Ser Leu Asp

50 55 60

Phe Pro Leu Asn Arg Leu Val Ala Ser Ser Ser Arg Ala Phe Leu Asn

65 70 75 80

Ser Ser

<210> 9

<211> 641

<212> DNA

<213> Mus musculus.

<220>

<221> misc_feature

<222> (325)..(325)

<223> Unidentified nucleotide.

<220>

<221> misc_feature

<222> (329)..(329)

<223> Unidentified nucleotide.

<400> 9

aggggcggga ccgggcgggt tgcggagggt aggcacgcgg aggccgggcc atgcgtgcgg	60
gccggtgtgc cgcggcgctg ctgctgctgc tactgagcgg cgcggggcgc gcgatcggct	120
ccgaggacat cgtggtaggc tgcgggggtt tcgtgaagtc ggacgtggag atcaactact	180
cgctcatcga gataaagtta tacaccaagc atgggacttt gaaatatcag acggactgtg	240
ctcctaaciaa cggctacttt atgatccct tgtatgataa gggggatttc atcctgaaga	300
tcgaacctcc tctgggctgg agtntganc caaccaacgt gtagctgcga gtggatggtg	360
tgagcgacat ctgcacgaag ggcggggaca tcaacttcct attcactggc ttctctgtga	420
atggcaaggt cctcagcaaa ggcagcccc tgggccagc aggagttcag gtatccctga	480
gaagcaccgg tgctgactcg aagatccagt ctacagtcac gcagcctggc ggaaagtgtg	540
cgtttttcca agttcttcct ggagattatg aaatccttgc aactcaccg acctgggccc	600

tgaaggaggc aagtaccacg gtgcgtgtga cgaactcgaa t

641

<210> 10

<211> 97

<212> PRT

<213> Mus musculus.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (92)..(92)

<223> Tyr, Cys, Ser or Phe.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (93)..(93)

<223> Glu or Asp.

<400> 10

Met Arg Ala Gly Arg Cys Ala Ala Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ser

1 5 10 15

Gly Ala Gly Arg Ala Ile Gly Ser Glu Asp Ile Val Val Gly Cys Gly

20 25 30

Gly Phe Val Lys Ser Asp Val Glu Ile Asn Tyr Ser Leu Ile Glu Ile

35 40 45

Lys Leu Tyr Thr Lys His Gly Thr Leu Lys Tyr Gln Thr Asp Cys Ala

50 55 60

Pro Asn Asn Gly Tyr Phe Met Ile Pro Leu Tyr Asp Lys Gly Asp Phe

65 70 75 80

Ile Leu Lys Ile Glu Pro Pro Leu Gly Trp Ser Xaa Xaa Pro Thr Asn
 85 90 95

Val

<210> 11

<211> 930

<212> DNA

<213> Mus musculus.

<400> 11

```

agggggacccg cggcacgagc gagagctcgc cagccccgcc acgatgcccc cgcgcccagg      60
acgcctcctc cagccgctgg ccgggctgcc ggccctggcc acgctcctgc tgctgctcgg      120
ggcgcgcaaa ggcgcccggg cccaggaggt ggaagcggac agcgggggtcg agcaggaccc      180
gcacgccaag cacctgtata cggccgacat gttcacgcac gggatccaga gcgccgcgca      240
cttcgtcatg ttcttcgcgc cctgggtgtgg aactgccag cggctgcagc caacttgga      300
tgacctggga gacaagtaca acagcatgga ggatgccaag gtctacgtgg ccaaagtgga      360
ctgcacggct gattccgacg tgtgctctgc ccagggagtg cgaggatacc ccaccctgaa      420
gttttttaag cctggacaag aagcagtga gtaccagggt cctagagact ttgaaacact      480
ggaaaactgg atgctgcaga cactgaacga ggagccagcc acaccggagc cggaagcgga      540
accacccaga gccctgagc tcaaacaggg gttgtatgag ctctcggcca acaactttga      600
gctgcatgtt tctcaaggca accactttat caagttcttc gctccgtggg gcggtcactg      660
caaagctctg gtcacaacct gggagcagct ggctctgggc cttgaacatt ctgaaaccgt      720
caagattggc aaggttgact gcacgcagca ctacgtgtc tgctcagagc atcaggtcag      780
aggctatcca actctgctct ggtttcgaga tggcaagaag gtggatcagt acaagggaaa      840
gcgggacttg gactcactga gagactatgt gcagtcccag ctgcagggtt cagaggcagc      900
tccggagact gttgagccgt cagaggcccc                                     930

```

<210> 12
<211> 295
<212> PRT
<213> Mus musculus.

<400> 12

Met Pro Pro Arg Pro Gly Arg Leu Leu Gln Pro Leu Ala Gly Leu Pro
1 5 10 15
Ala Leu Ala Thr Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Arg Lys Gly Ala Arg
 20 25 30
Ala Gln Glu Val Glu Ala Asp Ser Gly Val Glu Gln Asp Pro His Ala
 35 40 45
Lys His Leu Tyr Thr Ala Asp Met Phe Thr His Gly Ile Gln Ser Ala
 50 55 60
Ala His Phe Val Met Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Gln Arg
65 70 75 80
Leu Gln Pro Thr Trp Asn Asp Leu Gly Asp Lys Tyr Asn Ser Met Glu
 85 90 95
Asp Ala Lys Val Tyr Val Ala Lys Val Asp Cys Thr Ala Asp Ser Asp
 100 105 110
Val Cys Ser Ala Gln Gly Val Arg Gly Tyr Pro Thr Leu Lys Phe Phe
 115 120 125
Lys Pro Gly Gln Glu Ala Val Lys Tyr Gln Gly Pro Arg Asp Phe Glu
 130 135 140
Thr Leu Glu Asn Trp Met Leu Gln Thr Leu Asn Glu Glu Pro Ala Thr
145 150 155 160
Pro Glu Pro Glu Ala Glu Pro Pro Arg Ala Pro Glu Leu Lys Gln Gly.
 165 170 175
Leu Tyr Glu Leu Ser Ala Asn Asn Phe Glu Leu His Val Ser Gln Gly

180	185	190
Asn His Phe Ile Lys Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Ala		
195	200	205
Leu Ala Pro Thr Trp Glu Gln Leu Ala Leu Gly Leu Glu His Ser Glu		
210	215	220
Thr Val Lys Ile Gly Lys Val Asp Cys Thr Gln His Tyr Ala Val Cys		
225	230	235
Ser Glu His Gln Val Arg Gly Tyr Pro Thr Leu Leu Trp Phe Arg Asp		
245	250	255
Gly Lys Lys Val Asp Gln Tyr Lys Gly Lys Arg Asp Leu Glu Ser Leu		
260	265	270
Arg Asp Tyr Val Gln Ser Gln Leu Gln Gly Ser Glu Ala Ala Pro Glu		
275	280	285
Thr Val Glu Pro Ser Glu Ala		
290	295	

<210> 13

<211> 94

<212> PRT

<213> Mus musculus.

<400> 13

Met Ser Ser Arg Pro Thr Thr Leu Ser Cys Met Phe Leu Lys Ala Thr		
1	5	10
Thr Leu Ser Ser Ser Ser Leu Arg Gly Ala Val Thr Ala Lys Leu Trp		
20	25	30
Leu Gln Pro Gly Ser Ser Trp Leu Trp Ala Leu Asn Ile Leu Lys Pro		
35	40	45

Ser Arg Leu Ala Arg Leu Thr Ala Arg Ser Thr Thr Leu Ser Ala Gln
 50 55 60
 Ser Ile Arg Ser Glu Ala Ile Gln Leu Cys Ser Gly Phe Glu Met Ala
 65 70 75 80
 Arg Arg Trp Ile Ser Thr Arg Glu Ser Gly Thr Trp Ser His
 85 90

<210> 14
 <211> 222
 <212> DNA
 <213> Mus musculus.

<400> 14
 ctcaccgtcg ccatggctcc gttaccgctc ttactgctc tgcgcgctgc tcctcctggc 60
 gctgtgcgca ctgtgcctt cccatgcagc caccacatca cggggcaggg cccaagagag 120
 ggcgccccaa agtcgggtgt ctgaggcgcg gccagcaca gtggcggccg ccctggagct 180
 gcgcccgcga tgtggcgcta ccgtttacag ctgcgcgaga gg 222

<210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus.

<400> 15
 Met Trp Arg Tyr Arg Leu Gln Leu Arg Glu Arg
 1 5 10

<210> 16
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Mus musculus.

<400> 16

Met	Gln	Pro	Pro	His	His	Gly	Ala	Gly	Pro	Lys	Arg	Gly	Arg	Pro	Lys
1				5					10					15	
Val	Gly	Cys	Leu	Arg	Arg	Gly	Pro	Ala	Gln	Trp	Arg	Pro	Pro	Trp	Ser
				20				25						30	
Cys	Ala	Arg	Asp	Val	Ala	Leu	Pro	Phe	Thr	Ala	Ala	Arg	Glu		
				35				40						45	

<210> 17
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> Mus musculus.

<400> 17

ccggcgctccg	gcagatgcac	gcggggcggg	ggccggggga	gaggcgggga	gagagaaccc	60
acaacaaaac	ttggctcgct	gcgcccacgg	ctcgacttga	atgacaggag	ccggcgcccg	120
cggagcgcag	cggacacccg	cgagcctgtt	ccgcccacgg	cgcggcgcgc	agcggcaggt	180
gctggcaagg	gccagtggca	tcagatcccc	cagagctggg	gttacaggtg	gttgtgagtc	240
atcccagaga	gtgctgggct	cagtcttctg	tgagcagagc	actgctctta	acagataagc	300
ttgtggactt	ttatggagac	aagccaaagg	tgagagaaga	aagccagcct	gtccagcacc	360
atggctggca	gcaggggcct	gccactccta	ctgctggtgc	ttcagctctt	cctgggcctt	420
gtgctgcctg	tgagggcacc	tgtgtttggc	cgaagtgaca	ccccaccct	gagccccgag	480

gagaatgaat ttgtggagga agagaatcag ccagtgtctg ttctgagctc cgaggagcca 540
 gagcctggcc cagccactgt cgactgtccc cgagattgtg cctgttccca ggaaggtgta 600
 gtggactgtg gtggcattga cctgcgtgag tticcaggcg acctgcccga gcacaccaac 660
 catctctcct tgcagaacaa ccagctggag aagatctacc ccgaggagct gtcccggctg 720
 cagcggctgg agacgtgaa cctgcagaac aaccgc 756

<210> 18
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Mus musculus.

<400> 18
 Met Ala Gly Ser Arg Gly Leu Pro Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Phe Leu Gly Pro Val Leu Pro Val Arg Ala Pro Val Phe Gly Arg Ser
 20 25 30
 Asp Thr Pro Thr Leu Ser Pro Glu Glu Asn Glu Phe Val Glu Glu Glu
 35 40 45
 Asn Gln Pro Val Leu Val Leu Ser Ser Glu Glu Pro Glu Pro Gly Pro
 50 55 60
 Ala Thr Val Asp Cys Pro Arg Asp Cys Ala Cys Ser Gln Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Val Asp Cys Gly Gly Ile Asp Leu Arg Glu Phe Pro Gly Asp Leu Pro
 85 90 95
 Glu His Thr Asn His Leu Ser Leu Gln Asn Asn Gln Leu Glu Lys Ile
 100 105 110
 Tyr Pro Glu Glu Leu Ser Arg Leu Gln Arg Leu Glu Thr Leu Asn Leu
 115 120 125

Gln Asn Asn Arg

130

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus.

<400> 19

Met Asn Leu Trp Arg Lys Arg Ile Ser Gln Cys Trp Phe

1

5

10

<210> 20

<211> 934

<212> DNA

<213> Mus musculus.

<220>

<221> misc_feature

<222> (605)..(605)

<223> Unidentified nucleotide.

<400> 20

ccgaggttca agaggagcct agggagtggc agctctcgct gaccggcggg tcccagagac	60
ctgcccccaa ggtgtccac tgtgtggcta aggggtgggat agaaccggg ctgggagagc	120
cgggttatgg gttccagtgg tggttccgcc gcttccttgc ttcgctctgt cttacctgg	180
cgttcagcct atttttcctc gtaagaattg gacacttttc cgtgcccctt ccataccgca	240

ggtggtgttc gtagaggctc tcacgctttt caaaaggcgt ctcatctaag acttgctaga 300
 accaacctga ctaaaggagt caccgtcata ccccccttgc acctggagta aatctgactg 360
 tccgaaggac gaaggaccgg tctgtgagca cttgtgctaa ggtggacttt attcacactc 420
 ctgagtggaa tattatttgt cactcactcc tgagtcctgc cgtttggagg ggctgccttt 480
 ggaaatgagt tctgggaact gaacacagga actgggtgcc tgtaccaggc ttgccatttg 540
 cctgaccgag ttactcttct ttggatcccg gcgctgcagt acttttgaat tgttcctgtg 600
 aaggncagaa gtaggtattt ggtcccttgg agctgtgagc tgatgtaggt gctgggaact 660
 cagctgtggt gtgctgcaag accaaggacg agtcttgagc tgtaagtgt tttcctcagg 720
 gtgctcagac ggtgaaaatc agagatcagg ccacctttct gtgagccttc agctgagtct 780
 aaaggtgtta ttgatcagaa tggcttcagg atggttttac ctgtcctgca tggtgctggg 840
 atcgctggga tcgatgtgca tcctcttcac tgcctactgg atgcagtact ggcgcggtgg 900
 ctttgcctgg gatggcacgg tgctcatgtt taac 934

<210> 21

<211> 40

<212> PRT

<213> Mus musculus.

<400> 21

Met Val Leu Pro Val Leu His Gly Ala Gly Ile Ala Gly Ile Asp Val

1

5

10

15

His Pro Leu His Cys Leu Leu Asp Ala Val Leu Ala Arg Trp Leu Cys

20

25

30

Leu Gly Trp His Gly Ala His Val

35

40

<210> 22

<211> 45

<212> PRT

<213> Mus musculus.

<400> 22

Met Ala Ser Gly Trp Phe Tyr Leu Ser Cys Met Val Leu Gly Ser Leu

1 5 10 15

Gly Ser Met Cys Ile Leu Phe Thr Ala Tyr Trp Met Gln Tyr Trp Arg

20 25 30

Gly Gly Phe Ala Trp Asp Gly Thr Val Leu Met Phe Asn

35 40 45

<210> 23

<211> 877

<212> DNA

<213> Mus musculus.

<400> 23

ctccgccgca gttctcggtg ggctgccggg cagccctccc gccatgcacc tgctgcttgc 60

agccgcgttc gggctgctgc tgctgctgcc gccgcccggg gccgtagcct cccggaagcc 120

gacgatgtgc cagagatgcc ggacgctggt ggacaagttc aaccagggga tggccaacac 180

ggccaggaag aatttcggtg gcggcaacac ggcgtgggaa gagaagacgc tgtctaagta 240

cgaattcagt gagatccggc ttctggagat catggagggt ctgtgtgaca gcagtgactt 300

tgagtgaac caactcttgg agcagcagga ggagcagcta gaggcttggt ggcagacact 360

gaagaaggag caccccaacc tatttgagt gttctgtgta cacacactga aagcgtgctg 420

tcttcaggc acctacgggc cagactgtca agagtgccag ggtgggtccg agaggccttg 480

cagcggaac ggctattgca gcggagacgg cagcagacag ggcgacgggt cctgccagtg 540

tcacacaggc tacaaggac cactgtgtat tgactgcaca gacggcttct tcagcttgca 600

gaggaacgag acccacagca tctgctcagc ctgtgatgag tcttgcaaga cctgctctgg 660
 tccaagcaac aaagactgta tccagtgtga agtgggctgg gcacgtgtgg aggatgcctg 720
 tgtggatgtg gatgagtgtg cagcagagac atctccgtgc agcgatggcc agtactgtga 780
 gaatgtcaac ggctcgtaca catgtgaaga ctgtgattct acctgcgtgg gctgtacagg 840
 aaaaggccca gcccaactgta aggagtgtat tgccggc 877

<210> 24

<211> 278

<212> PRT

<213> Mus musculus.

<400> 24

Met His Leu Leu Leu Ala Ala Ala Phe Gly Leu Leu Leu Leu Pro
 1 5 10 15
 Pro Pro Gly Ala Val Ala Ser Arg Lys Pro Thr Met Cys Gln Arg Cys
 20 25 30
 Arg Thr Leu Val Asp Lys Phe Asn Gln Gly Met Ala Asn Thr Ala Arg
 35 40 45
 Lys Asn Phe Gly Gly Gly Asn Thr Ala Trp Glu Glu Lys Thr Leu Ser
 50 55 60
 Lys Tyr Glu Phe Ser Glu Ile Arg Leu Leu Glu Ile Met Glu Gly Leu
 65 70 75 80
 Cys Asp Ser Ser Asp Phe Glu Cys Asn Gln Leu Leu Glu Gln Gln Glu
 85 90 95
 Glu Gln Leu Glu Ala Trp Trp Gln Thr Leu Lys Lys Glu His Pro Asn
 100 105 110
 Leu Phe Glu Trp Phe Cys Val His Thr Leu Lys Ala Cys Cys Leu Pro
 115 120 125

Gly Thr Tyr Gly Pro Asp Cys Gln Glu Cys Gln Gly Gly Ser Glu Arg
 130 135 140
 Pro Cys Ser Gly Asn Gly Tyr Cys Ser Gly Asp Gly Ser Arg Gln Gly
 145 150 155 160
 Asp Gly Ser Cys Gln Cys His Thr Gly Tyr Lys Gly Pro Leu Cys Ile
 165 170 175
 Asp Cys Thr Asp Gly Phe Phe Ser Leu Gln Arg Asn Glu Thr His Ser
 180 185 190
 Ile Cys Ser Ala Cys Asp Glu Ser Cys Lys Thr Cys Ser Gly Pro Ser
 195 200 205
 Asn Lys Asp Cys Ile Gln Cys Glu Val Gly Trp Ala Arg Val Glu Asp
 210 215 220
 Ala Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Ala Glu Thr Ser Pro Cys Ser
 225 230 235 240
 Asp Gly Gln Tyr Cys Glu Asn Val Asn Gly Ser Tyr Thr Cys Glu Asp
 245 250 255
 Cys Asp Ser Thr Cys Val Gly Cys Thr Gly Lys Gly Pro Ala Asn Cys
 260 265 270
 Lys Glu Cys Ile Ala Gly
 275

<210> 25

<211> 80

<212> PRT

<213> Mus musculus.

<400> 25

Met Ser Leu Ala Arg Pro Ala Leu Val Gln Ala Thr Lys Thr Val Ser

1 5 10 15
Ser Val Lys Trp Ala Gly His Val Trp Arg Met Pro Val Trp Met Trp
 20 25 30
Met Ser Val Gln Gln Arg His Leu Arg Ala Ala Met Ala Ser Thr Val
 35 40 45
Arg Met Ser Thr Ala Arg Thr His Val Lys Thr Val Ile Leu Pro Ala
 50 55 60
Trp Ala Val Gln Glu Lys Ala Gln Pro Thr Val Arg Ser Val Leu Pro
65 70 75 80

<210> 26

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying cDNA
derived from mouse white adipocyte.

<400> 26

gggggtggac catcctcta

19

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying cDNA
derived from mouse white adipocyte.

<400> 27

cgcgagctg taaacggtg

20

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 脂肪細胞由来の新規分泌／膜蛋白質遺伝子の提供。

【解決手段】 配列番号 1、3、5、9、11、14、17、20 または 23 で表わされる塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基酸配列を含有する新規脂肪細胞由来分泌／膜蛋白質遺伝子、それにコードされる蛋白質断片、該断片を含む蛋白質。該蛋白質、それをコードする DNA 等を用いた脂肪細胞の分化／代謝機能に関連する疾患の予防・治療薬のスクリーニング方法などを提供する。

【選択図】 なし

特願 2002-201856

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[000002934]

1. 変更年月日

1992年 1月22日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

氏 名

武田薬品工業株式会社

2. 変更年月日

2003年 5月 9日

[変更理由]

名称変更

住所変更

住 所

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

氏 名

武田薬品工業株式会社